



# Estudio de la Estructura y Función de la Ruta SOS

Memoria que presenta: **José Ramón Moreno Campos**

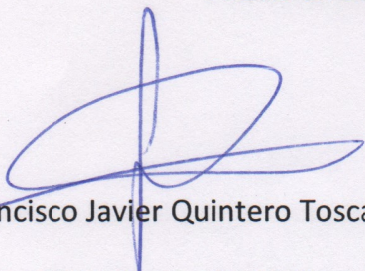
Para optar al título de Doctor en Biotecnología

Junio 2017



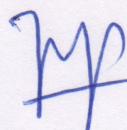
# Estudio de la Estructura y Función de la Ruta SOS

Visado en Sevilla, a 27 de junio de 2017



Dr D. Francisco Javier Quintero Toscano

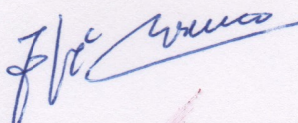
Científico Titular del CSIC



Dr D. José Manuel Pardo Prieto

Profesor de Investigación del CSIC

LOS DIRECTORES



Dr. D. José María Romero Rodríguez

Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis

(Universidad de Sevilla – CSIC)

EL TUTOR

**El presente trabajo se ha realizado gracias a la financiación del Programa de Formación de Profesorado Universitario -ORDEN EDU/3083/2009 del Ministerio de Educación, en el marco del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2008-2011**

**Memoria que presenta**

**D. José Ramón Moreno Campos**

**para optar al grado de Doctor en Biotecnología**



DOCTOR D. ENRIQUE FERNANDEZ LUQUE, DIRECTOR DEL INSTITUTO DE RECURSOS  
NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA DEL CONSEJO SUPERIOR DE  
INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Certifica: Que la presente Memoria de Investigación titulada "Estudio de la Estructura y Función de la Ruta SOS", presentada por D. José Ramón Moreno Campos para optar al grado de Doctor en Biotecnología, ha sido realizada en el Departamento de Biotecnología Vegetal, bajo la dirección de los Drs. D. Francisco Javier Quintero Toscano y D. José Manuel Pardo Prieto, reuniendo todas las condiciones exigidas a los trabajos de Tesis Doctorales.



En Sevilla, a 27 de junio de 2017

José Enrique Fernández Luque

## *Agradecimientos*

El trabajo contenido en esta memoria ha sido posible gracias a la colaboración y apoyo de multitud de compañeros, colegas y familiares. Aunque no estén todos aquí recogidos, quiero hacer mención especial de algunos de ellos:

A mis directores, Javier Quintero y José Manuel Pardo, por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio, por dirigirme durante este complicado proceso y por enseñarme todo lo que sé de esta profesión.

A Irene, Imelda, Javier, Fran, Hiroaki Fujii, Juan de Dios López y Guo Yan, cuyo trabajo ha sido fundamental para la escritura de esta Tesis.

A Imelda, M<sup>a</sup> Ángeles y Anna, por el millón de veces que me han salvado la vida desinteresadamente con su trabajo y por el cariño recibido durante todos estos años.

A Zaida, Kaouther y Carlos, por ayudarme con mis primeros pasos.

A Irene y Bea, que me conocieron siendo un niño, por todo lo que han enseñado y por ser pacientes cuando más difícil era.

A Fran, a Paula y a Belén, por aparecer y hacer que todo fuera mejor.

A Javi, por hacer todo más fácil con su espíritu, por todo lo que he aprendido de él y, sobre todo, por ser mi amigo.

A Elena, junto a la que he recorrido todo este camino y de la que solo guardo buenos recuerdos, ánimos en las malas y risas en las buenas. Te debo mucho, compañera.

A Marta y a José María, por todos los buenos momentos que hemos pasado dentro y fuera del instituto.

A Virginia, por la maniobra más cara para conocer a alguien que he visto jamás y por todo lo que vino después.

A Belén, que no hay en el castellano palabras para expresar todo lo que ha hecho por mi.

A todos los amigos y compañeros que me han acompañado a través de estos años, ayudándome a llegar al otro lado.

A mis padres y a mi hermana, fundadores y guardianes de todo lo bueno que hay en mi.



## Índice

Introducción .....	11
Salinización del suelo .....	11
Efectos de la sal en las plantas .....	15
Respuestas adaptativas frente estrés salino.....	16
Respuesta y mecanismo de control de la salinidad .....	17
Mecanismos intracelulares de regulación de la homeostasis iónica. ....	20
Expulsión del sodio a través de la membrana plasmática .....	20
Compartimentación de Na <sup>+</sup> y Cl <sup>-</sup> en la vacuola. ....	21
Respuesta y mecanismos de homeostasis no-iónica de respuesta al estrés salino.....	22
Ajuste osmótico.....	22
Respuesta antioxidante.....	22
Sensores y vías de señalización de la respuesta halotolerante. ....	23
Mensajeros secundarios y metabolitos señalizadores de la respuesta al estrés salino ....	24
El calcio.....	24
Especies reactivas de oxígeno (ROS).....	26
Lípidos de membrana.....	27
Proteínas y rutas metabólicas implicadas en la respuesta al estrés abiótico .....	30
Proteínas MAPKs .....	30
MPK3, MPK4 y MPK6.....	37
Proteín quinasas SnRK.....	38
SnRK1.....	39
SnRK2.....	40
SnRK3.....	42
Regulación N-terminal de las proteínas SnRK .....	44
LRR-RKs.....	47
GSO1.....	49
Ruta SOS .....	52
SOS1 .....	53
SOS2 .....	55
SOS3 .....	56
Modelo general.....	57
Objetivos .....	60



Materiales y métodos. ....	62
Material biológico. ....	62
Bacterias. ....	62
Líneas usadas.....	62
Medios y condiciones de cultivos bacterianos.....	63
Levaduras. ....	65
Cepas de levadura usadas. ....	65
Medios y condiciones de cultivos de levaduras. ....	66
Material vegetal ....	69
Especies y líneas vegetales.....	69
Cultivo y crecimiento de <i>A. thaliana</i> . ....	70
Medios de cultivo vegetal ....	70
Condiciones de crecimiento in vitro.....	71
Esterilización de semillas.....	72
Condiciones de crecimiento en suelo. ....	72
Recolección de semillas.....	72
Cultivo y crecimiento de <i>Nicotiana benthamiana</i> . ....	73
Transformaciones.....	74
Vectores. ....	74
Transformación de bacterias.....	74
Preparación de células competentes. ....	74
<i>E. coli</i> . ....	74
<i>A. tumefaciens</i> .....	75
Transformación de <i>E. coli</i> . ....	76
Transformación de <i>Agrobacterium</i> . ....	76
Transformación de levaduras.....	77
Transformación de plantas.....	78
Transformación de <i>A. thaliana</i> . ....	78
Transformación transitoria de <i>Nicotiana benthamiana</i> . ....	79
Caracterización de levaduras. ....	80
Ensayos de crecimiento de levaduras. ....	80
Caracterización de <i>Arabidopsis</i> . ....	80
Caracterización fenotípica de líneas de <i>A. thaliana</i> en cultivo hidropónico. ....	80
Tolerancia a salinidad.....	80

Caracterización fenotípica de plantas de Arabidopsis. ....	81
Caracterización fenotípica de líneas de A. thaliana en cultivo in vitro. ....	81
Germinación y supervivencia. ....	81
Elongación de raíz. ....	81
Medición del contenido iónico.....	82
Manipulación de ácidos nucleicos. ....	82
Purificación y análisis de ADN. ....	82
Purificación de ADN plasmídico. ....	83
E. coli. ....	83
Minipreparación de ADN plasmídico (miniprep) ....	83
Maxipreparación de ADN plasmídico (maxiprep) ....	84
Levaduras. ....	86
Purificación de ADN genómico.....	87
Purificación de ADN genómico de levaduras. ....	87
Purificación de ADN genómico de Arabidopsis.....	88
Precipitación del ADN.....	89
Precipitación con etanol-acetato de sodio.....	89
Precipitación con etanol-acetato de amonio. ....	89
Cuantificación del ADN.....	89
Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	90
Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa. ....	90
Manipulación enzimática del ADN. ....	90
Digestión del ADN con enzimas de restricción.....	90
Defosforilación de extremos 5' de ADN. ....	91
Generación de extremos romos de ADN. ....	91
Ligación de fragmentos de ADN. ....	92
Amplificación por PCR de fragmentos de ADN. ....	92
Cebadores de oligonucleótidos. ....	92
Amplificación con la polimerasa de ADN Taq. ....	93
Amplificación con polimerasas de alta fidelidad.....	93
PCR de colonias bacterianas.....	94
Mutagénesis dirigida por PCR. ....	94
Secuenciación de ADN.....	95
Producción, purificación y análisis de proteínas. ....	95

Producción de proteínas recombinantes desde bacteria. ....	95
Producción de proteínas recombinantes desde levadura. ....	97
Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE). ....	98
Tinción de geles de proteínas.....	100
Ensayo de fosforilación in vitro de proteínas.....	100
Defosforilación in vitro de proteínas.....	101
BiFC.....	101
Vectores. ....	102
Infiltración de <i>Agrobacterium</i> en hojas de <i>N. benthamiana</i> .....	102
Microscopía BiFC en <i>N. benthamiana</i> . ....	102
Transformación de <i>S. cerevisiae</i> . ....	103
Microscopía BiFC en <i>S. cerevisiae</i> . ....	103
Análisis estadísticos.....	103
Herramientas bioinformáticas. ....	104
Resultados .....	106
Activación de SOS1 por MAPKs.....	106
Análisis in silico del C-terminal de SOS1. ....	107
Fosforilación in vitro del C-terminal de SOS1 .....	109
Clonación y purificación de quinasas y sustratos.....	109
Fosforilación del extremo carboxilo terminal de SOS1 por MPK6, MPK3 y SOS2. ....	112
Caracterización funcional de los mutantes DSPS y la interacción SOS – MAPK. ....	114
Actividad en levaduras de mutantes de SOS1 en el motivo DSPS.....	114
Activación por MAPK de SOS1 en levaduras. ....	119
Efecto de las quinasas endógenas de levadura sobre la actividad de SOS1 y MPK6.....	123
Interacción entre SOS1 y MPK6. ....	125
Análisis del fenotipo de las plantas mutantes mpk3 y mpk6. ....	127
Activación de SOS2 por GRIK1 y GRIK2 .....	134
Análisis del lazo de activación de SOS2.....	134
Caracterización fenotípica de los mutantes S159A, T168A y Y175A de SOS2 in planta. ....	134
Caracterización funcional del mutante S159A T168A Y175A en levaduras. ....	137
Identificación de las proteínas GRIK1 y GRIK2 .....	138
Fosforilación de SOS2 por proteínas GRIK. ....	139
Caracterización funcional de la fosforilación de SOS2 por GRIK1 en levadura. ....	142
Análisis del fenotipo de las plantas mutantes grik1 y grik2. ....	145

Interacción de GSO1 con el sistema SOS. ....	149
Caracterización fenotípica del mutante gso1 bajo tratamiento de estrés salino.....	149
Caracterización funcional de la interacción de GSO1 con el sistema SOS. ....	154
<b>Caracterización funcional de la interacción de GSO1 con HKT1.</b> ....	156
Efecto de GSO1 sobre la actividad quinasa de SOS2.....	160
<b>Discusión</b> .....	164
Regulación de SOS1 por MAPKs.....	164
Regulación de SOS2 por GRIK .....	174
Regulación de SOS2 por GSO1 .....	177
Respuesta General.....	183
<b>Conclusiones</b> .....	187
<b>Anexo 1. Abreviaturas</b> .....	189
<b>Anexo 2. Primers</b> .....	192
<b>Anexo 3. Plásmidos</b> .....	194
<b>Bibliografía</b> .....	199





## Introducción

### Salinización del suelo

Se conoce como salinización al proceso de acumulación en el suelo de altas concentraciones de sales hidrosolubles, que producen como resultado la alteración y desajuste de los procesos biológicos, bioquímicos, hidrológicos y de erosión del suelo (1).

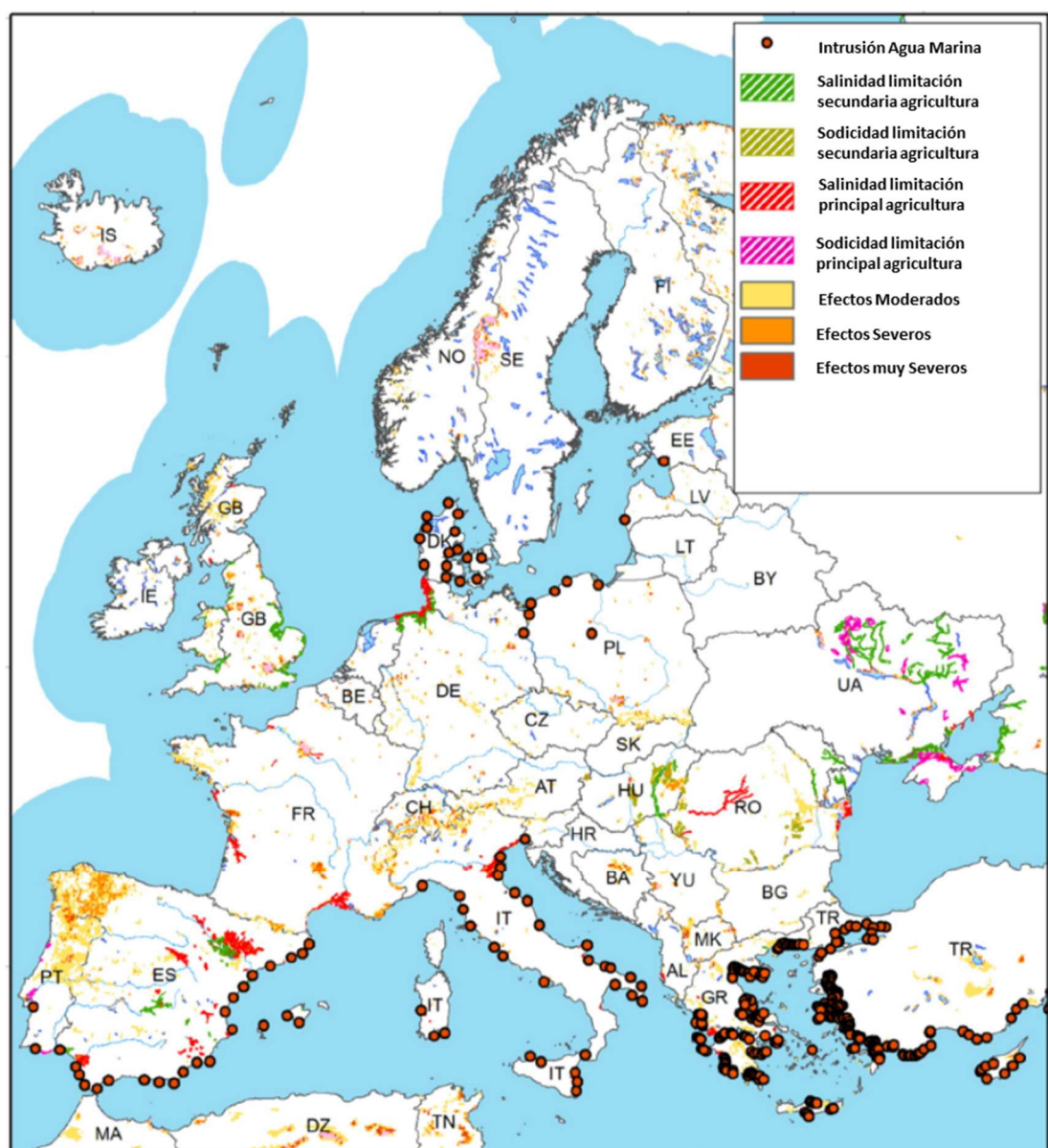
La salinización supone la degradación o pérdida de los recursos derivados de la utilización del suelo, lo que conlleva efectos negativos sobre la producción agronómica y el medioambiente (2), que pueden derivar en perjuicios de salud ambiental y socioculturales para el ser humano, incluyendo efectos económicos y sobre el bienestar (3).

La salinización de suelos es un fenómeno presente a escala planetaria, se contabilizan 932,2 millones de hectáreas salinizadas, siendo una de las principales causas de degradación de suelo a nivel mundial (1) y concentrándose en China, Estados Unidos, Pakistán, India, Argentina, Australia, Egipto, Sudan y la mayoría de países del sudeste asiático (4). En Europa existen 30,7 millones de hectáreas salinizadas (un 3,3% mundial), siendo la cuenca Mediterránea la zona de principal afectación (5).

Si el proceso de salinización de un suelo se produce por fenómenos de transporte y acumulación natural de sales, se le denomina **salinización primaria**. Esta puede producirse por filtración y evapotranspiración de aguas subterráneas, que por contacto con la roca madre poseen concentraciones de sales elevadas. Ejemplos de este fenómeno en Europa son la cuenca Mediterránea o la del Mar Caspio. También se producen procesos de salinización primaria, cuando existe algún tipo de sumersión de un suelo en agua de mar, debido a la transgresión sostenida de agua marina en el continente (Delta del Guadalquivir, Holanda) (6) o a la entrada puntual debido a tormentas o inundaciones (Francia, Dinamarca, Sur de Inglaterra) (7).

Cuando la salinización de un suelo se produce debido a la actividad del ser humano se le conoce como **salinización secundaria**. Este proceso se produce por

cualquier tratamiento de un suelo que produzcan una acumulación de sal en el mismo, acompañado de un proceso de drenado inefectivo (8, 9). La principal causa de este fenómeno es la utilización para el riego de aguas subterráneas con un contenido salino significativo, que puede evitarse utilizando agua con una calidad mineral adecuada (5, 10). Se calcula que alrededor de 34,19 millones de hectáreas en todo el mundo se encuentran afectadas por la salinización como consecuencia de irrigación deficiente (10), esto es el 10% de las zonas de cultivo de irrigación mundial (4).



**Fig. 1 Mapa de Salinidad y Sodicidad en Europa.** Distribución de terrenos salinizados en Europa. Figura extraída de Dalikopoulos et al. (1) y adaptada.

También tienen un efecto sobre los niveles de salinidad de un suelo todas las prácticas agronómicas que producen la retención de agua en el mismo, como son la no retirada de aguas de lluvia, la filtración de agua proveniente de canales o reservorios de aguas mal aislados, la distribución no homogénea del riego, el drenaje inadecuado del suelo o la eliminación de la flora en los alrededores. Todas estas prácticas incrementan el riesgo de salinización del suelo permitiendo que la sal presente en las capas inferiores del suelo ascienda afectando a las raíces (1, 10–12). En menor medida, se han descrito procesos de salinización por tratamientos con fertilizantes, uso como riego de aguas residuales provenientes de depuradoras, industria o minería; o uso de sal como descongelante en lugares con nieves frecuentes (1, 10, 12–15).

Se estima que alrededor de 4 millones de hectáreas en Europa se encuentran afectadas por la salinización secundaria (16), siendo la principal fuente de desertización en los alrededores de la costa mediterránea. Este fenómeno se debe fundamentalmente al uso de agua con sal para la irrigación de cultivos, lo que produce una bajada del nivel freático y una intrusión de agua de mar en los suelos continentales (5, 10).

En el caso de la cuenca Mediterránea el riesgo es aún mayor, pues los cultivos de regadío en climas áridos, son los más susceptibles a este tipo de salinización debido a las escasas precipitaciones, las bajas tasas de evapotranspiración y a las composiciones químicas del suelo que dificultan el lavado natural de las sales (1), lo que hace de la salinización el principal factor limitante para la producción de cultivos de interés agronómicos en zonas semiáridas cercanas al mar (17).

Cabe destacar que las predicciones hidrológicas del calentamiento global indican una subida de los niveles del agua marina, además de variaciones en el ciclo del agua (18–20), lo que conllevaría un aumento de la salinización de los acuíferos costeros y continentales. Adicionalmente, se espera un aumento en los procesos de evapotranspiración, lo que incrementará la salinización de las aguas subterráneas superficiales, especialmente en climas áridos y semiáridos (8, 21–23).

Aunque los principales cultivos de interés agronómico presentes en Europa (trigo, centeno, girasol o cebada) son moderadamente tolerantes a la salinidad (16-32



dS m<sup>-1</sup>), la mayoría de cultivos de interés consumidos en el mundo (arroz, sésamo, legumbres, mayoría de plantas leñosas frutales), son halosensibles (<16 dS m<sup>-1</sup>)(24).

Para el control de la salinización del suelo son fundamentales las prácticas agronómicas adecuadas en el riego y mantenimiento de los cultivos. Se han propuesto diversos métodos para la remediación de suelos salinizados, como el lavado de las sales mediante riego con agua de lluvia, junto a un drenaje artificial del agua filtrada mediante desagües subterráneos. Desgraciadamente estas técnicas suponen costes inasumibles para la mayoría de productores (25) o requieren de la aplicación de metodologías *ad hoc*, no aplicables en otros ambientes afectados (1).

Es por ello que nace el estudio de la mejora de la tolerancia de los cultivos de interés a la presencia de sal en el suelo, como solución complementaria a la mejora de prácticas agronómicas. Para ello, se busca el alivio de la sensibilidad a la sal de los cultivos de interés agronómico mediante la introgresión genética de efectores de tolerancia a salinidad, utilizando técnicas clásicas de selección y cruce o mejora mediante la determinación de marcadores e ingeniería genética (26–29). Las técnicas de mejora clásica vegetal se han mostrado históricamente incapaces de encontrar mecanismos adaptativos de halotolerancia que no afecten negativamente a la productividad del cultivo (30, 31). Del mismo modo, se ha observado que todos los cultivos altamente productivos desarrollados en los últimos años presentan un acervo genético para la halotolerancia muy limitado, lo que sugiere una correlación negativa entre la tolerancia a la sal y los elevados rendimientos productivos (29–32). Es por ello que se ha recurrido a la biotecnología como herramienta para el análisis y modificación de los genes implicados en los mecanismos de resistencia a sal y para la determinación de la relación entre estos y los mecanismos de desarrollo y crecimiento de la planta (26, 33).

## Efectos de la sal en las plantas.

Debido a su naturaleza sésil, las plantas superiores están sometidas inexorablemente a las condiciones ambientales y por tanto han desarrollado mecanismos de adaptación y tolerancia a las inclemencias ambientales.

La acumulación de sal en el suelo produce en la planta una reducción drástica del crecimiento y una disminución de la productividad, efectos que se producen por alteraciones en el desarrollo y nutrición de la planta, incluyendo el retraso o detención de la germinación, deficiencias nutricionales, reducción de la tasa de fotosíntesis y de la síntesis de pigmentos fotosintéticos. Esta alteración general del crecimiento de la planta se produce por un triple efecto de la sal en el suelo y en las plantas: **estrés osmótico, estrés salino y estrés oxidativo**.

El exceso de sales en el agua presente en la rizosfera provoca una reducción del potencial hídrico del suelo, lo que dificulta la entrada de agua en la planta. Esto provoca la deformación de las membranas celulares y la pérdida de turgencia, impidiendo la expansión celular y el crecimiento de la planta, un efecto similar al producido por la sequía (26, 34, 35). La impermeabilización de las membranas producidas por la deshidratación reducen también la actividad fotosintética debido a la disminución de la difusión de  $\text{CO}_2$  (36) y reduce la tasa de germinación debido a la disrupción del proceso de imbibición de la semilla (37).

El flujo de evapotranspiración de la planta, facilita la difusión de los iones presentes en el suelo al espacio apoplástico. La acumulación de sales en este espacio, además de someter a la célula a un estrés hídrico, produce alteraciones en la homeostasis iónica celular provocando desequilibrios en las concentraciones celulares de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  y del  $\text{Ca}^{2+}$  (38). El exceso de iones  $\text{Na}^+$  en el exterior celular provoca un flujo al interior celular de este catión, reduciendo el potencial de membrana y favoreciendo la pérdida de  $\text{K}^+$  y la entrada de  $\text{Cl}^-$ . La acumulación de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el interior celular inhibe multitud de procesos celulares, tanto en el citosol como en los orgánulos. Una acumulación citoplasmática de  $\text{Na}^+$  de más de 400 mM inhibe la mayoría de actividades enzimáticas, debido a la desnaturalización electroestática de

las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas, lo que tiene un efecto directo sobre la síntesis de proteínas, metabolismo energético y de síntesis de lípidos, pudiendo llegar a activarse procesos de muerte celular programada (26, 39, 40). Adicionalmente, la presencia de  $\text{Na}^+$  en el apoplasto y citoplasma afecta a la especificidad de los transportadores y canales por el  $\text{K}^+$ , provocando deficiencias nutricionales y la desregulación del cierre del estoma, lo que provoca pérdidas adicionales de agua. Este proceso de competición iónico también tiene un efecto sobre la capacidad de adquisición de otros nutrientes minerales como el P, el N, el  $\text{Ca}^{2+}$  o el  $\text{K}^+$  (33). Otros procesos biológicos afectados por la acumulación de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  son la reducción de la tasa fotosintética debido a una reducción del contenido de clorofila y descensos en los niveles de carotenoides y xantofilas (41), así como a un efecto directo de los iones sobre el fotosistema II (42), alterando la cadena de transporte de electrones y la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  (43). También se ha observado efectos directos de la sal sobre la germinación debido a la alteración de actividades enzimáticas del metabolismo del ADN (44), proteínas (45) y balance hormonal (46).

Finalmente, el déficit hídrico y la acumulación de iones tienen un profundo efecto negativo sobre el proceso de fijación del  $\text{CO}_2$  y otras actividades celulares, provocando la acumulación de especies reactivas de oxígeno (el ion superóxido  $\text{O}_2^-$ , peróxido de hidrógeno  $\text{H}_2\text{O}_2$ , radicales hidroxilo  $\text{OH}^\bullet$  y oxígeno singlete  $^1\text{O}_2$ ) en los distintos compartimentos celulares (39, 47, 48). Estos compuestos provocan daños oxidativos, entre los que se encuentran la peroxidación de lípidos, la oxidación de proteínas, la inactivación de enzimas, daños en el ADN e interacciones con componentes de la pared celular (49–51).

### Respuestas adaptativas frente estrés salino.

La presencia de altas concentraciones de sal en el citoplasma de una célula vegetal tiene graves consecuencias fisiológicas en cualquier especie. Es por ello que existen mecanismos moleculares y bioquímicos que actúan sinérgicamente para la adaptación de la planta a la presencia de sal en el medio.

El factor fundamental en el mantenimiento de la halotolerancia para las células vegetales es el mantenimiento de la homeostasis iónica intracelular, la cual requiere del funcionamiento y coordinación de procesos que sean capaces de controlar la adquisición del sodio y de facilitar su acumulación en la vacuola, o la expulsión al exterior celular (26, 38, 52).

La acumulación de iones y otros osmolitos en el interior de la vacuola permite el ajuste osmótico celular, a la vez que favorece la detoxificación del citoplasma y permite la elongación celular mediante la acumulación de osmolitos compatibles en el citosol y la consiguiente acumulación de agua (26).

De manera coordinada con este proceso de acumulación intracelular, el excedente de  $\text{Na}^+$  se traslada al exterior celular, en un proceso controlado de movilización del catión que favorece su acumulación en los tejidos menos sensibles de la planta o la expulsión al exterior de la misma. Este proceso de transporte de larga distancia del  $\text{Na}^+$  consiste en la extrusión del exceso de  $\text{Na}^+$  al xilema de la raíz y el tallo y su posterior transporte a los tejidos no meristemáticos de la parte aérea, fundamentalmente hojas maduras, con bajos niveles de actividad metabólica. Posteriormente el exceso de sal acumulado en la parte aérea puede recircularse nuevamente a los tejidos vasculares, pudiendo acumularse en la estela de las zonas más maduras de la raíz (26, 53–57). Todo este procedimiento se encuentra coordinado con el control intracelular de los niveles de  $\text{Na}^+$ , permitiendo unos niveles de sodicidad tolerables en todos los tejidos de la planta.

La entrada del sodio en la raíz se produce por al menos tres vías conocidas. Existen dos rutas simplásticas, que se distinguen por su sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, y una ruta apoplástica, que se produce por discontinuidades en la banda impermeable de la endodermis en los tejidos más jóvenes de la raíz, como el ápice, o el nacimiento de las raíces secundarias (25, 58).

El potencial de membrana de los organismos vivos, siempre negativo en el interior celular respecto al exterior, favorece el transporte del  $\text{Na}^+$  al interior celular,

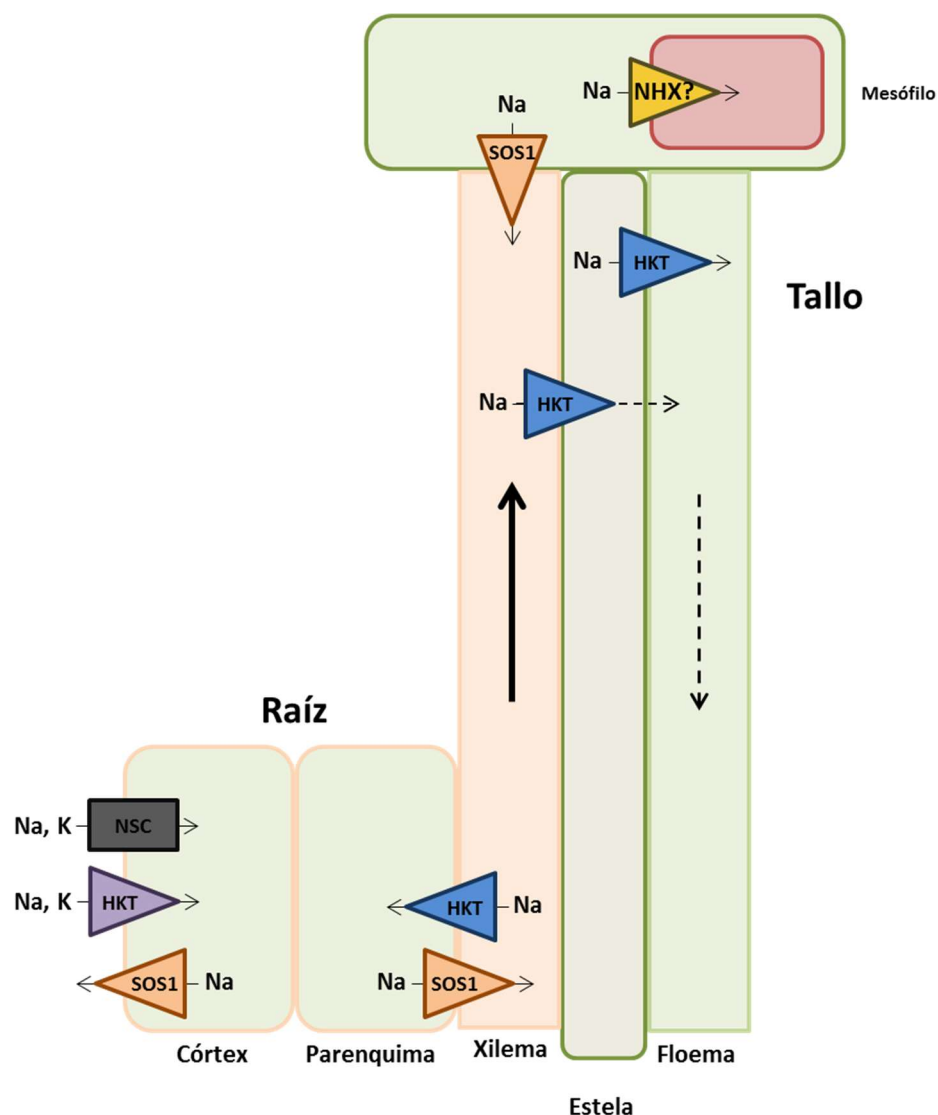


siendo este mediado por diversas proteínas. Está generalmente aceptado que los canales catiónicos no selectivos (*Non Selective Cation Channels*, NSCCs) son los principales efectores del influjo de  $\text{Na}^+$  al interior celular, aunque todavía falta una demostración genética convincente (59). Este tipo de canales se pueden inhibir por  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y se cree que constituyen la vía que macroscópicamente se ha caracterizado como sensible al  $\text{Ca}^{2+}$ . También se ha descrito entrada de  $\text{Na}^+$  al simplasto vía transportadores de cationes de baja afinidad (LTC1) (60), proteínas KIRCs (*K<sup>+</sup> Inner Rectifier Channels*, como el canal AKT1), KORCs (*K<sup>+</sup> Outer Rectifier Channels*) y proteínas de las familias KUP/HAK (*K<sup>+</sup> Uptake Protein/High Affinity K<sup>+</sup>*) (61–64), que conjuntamente formarían la vía simplástica insensible al  $\text{Ca}^{2+}$ .

Una vez en el interior celular, el  $\text{Na}^+$  se transporta intercelularmente vía plasmodesmos, que permiten el tránsito del  $\text{Na}^+$  hasta la capa interior de células que recubren la estela. Una vez ahí, el  $\text{Na}^+$  es transportado al xilema donde, impulsado por el flujo de evapotranspiración, es transportado hasta la parte aérea de la misma. Se ha descrito que la presencia de sal reduce inicialmente el nivel de flujo de evapotranspiración como mecanismo de defensa, mediante el cierre de los estomas, pero este proceso se revierte rápidamente, ya que bloquea el metabolismo general de la planta al afectar al control del balance hídrico, reducir la fijación de carbono por falta de  $\text{CO}_2$ , o impedir el transporte de otros solutos (26). Una vez alcanzado el espacio apoplástico foliar, el  $\text{Na}^+$  es reintroducido en el interior celular, donde se acumula en la vacuola, preferentemente en hojas de mayor edad y menor actividad metabólica. El posible exceso de  $\text{Na}^+$  en los tejidos de la parte aérea se remediaría mediante la recirculación a los tejidos vasculares (xilema y en menor medida floema), volviendo al balance de recirculación/compartimentación/expulsión descrito (26).

En *Arabidopsis thaliana* el antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de membrana plasmática SOS1 y el transportador de  $\text{Na}^+$  HKT1, son las dos principales proteínas encargadas del control de la carga y descarga del  $\text{Na}^+$  en los tejidos vasculares de la planta. El estudio de los patrones de expresión de estas proteínas en *Arabidopsis* ha mostrado una localización preferencial en las células que rodean los tejidos vasculares. Además, la distribución del contenido salino en los mutantes *sos1* y *hkt1* sugieren que, bajo regímenes de salinidad moderados, SOS1 induce el transporte de sodio hacia el xilema desde la raíz,

provocando su conducción hacia la parte aérea de la planta. Un aumento de la concentración de  $\text{Na}^+$  en la parte aérea produciría el bombeo de  $\text{Na}^+$  hacia el xilema por parte de SOS1, excluyéndolo nuevamente a la vasculatura. HKT1 jugaría un papel inverso en este mecanismo, permitiendo la recaptura de  $\text{Na}^+$  en el interior de las células parenquimáticas y manteniendo niveles aceptables de  $\text{Na}^+$  en el xilema. Es por tanto la actividad conjunta de ambas proteínas la que favorece el flujo y control de  $\text{Na}^+$  a través de la planta (56, 65).



**Fig. 2 Modelo de distribución del  $\text{Na}^+$  a larga distancia.** SOS1 mantiene los niveles fisiológicos de  $\text{Na}^+$  en el espacio simplástico de la raíz, expulsándolo al exterior de la planta o cargándolo en el xilema, desde donde es distribuido al resto de tejidos de la planta. HKT1 juega un papel complementario, favoreciendo la reentrada en la raíz, y la carga en el floema. El  $\text{Na}^+$  de la parte

aérea es compartimentado en la vacuola por algún efector desconocido o devuelto al xilema por SOS1. Adaptado de (66).

#### Mecanismos intracelulares de regulación de la homeostasis iónica.

El mantenimiento de la homeostasis global implica la regulación de los contenidos de sal en diversos espacios en el interior de la planta. El control del flujo de solutos entre distintos tejidos y órganos depende en última instancia del control celular del mismo, siendo las células las unidades responsables de la percepción de los niveles de  $\text{Na}^+$  en sus distintos espacios (vacuola, citoplasma y espacio apoplástico) y movilizarlo convenientemente.

#### *Expulsión del sodio a través de la membrana plasmática*

A diferencia de los organismos unicelulares, la expulsión activa de  $\text{Na}^+$  del citoplasma celular no supone una mecánica de detoxificación de la planta, sino un mecanismo de regulación de la entrada neta de  $\text{Na}^+$ , con un componente cooperativo entre células, tejidos y órganos que mantiene los niveles de  $\text{Na}^+$  en límites saludables en los puntos más sensibles de la planta.

En condiciones fisiológicas normales, el gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$  a través de la membrana plasmática establece un flujo electroquímico pasivo del ion, mientras que su eflujo requiere un gasto de energía (transporte activo). Las plantas, al contrario que animales y hongos, carecen de ATPasas de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , por lo que la extrusión citosólica del  $\text{Na}^+$  se produce mediante antiportadores electroneutros  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  que acoplan la salida de  $\text{Na}^+$  a la disipación del gradiente electroquímico de protones generado por las  $\text{H}^+$ -ATPasas de membrana plasmática. Estas ATPasas, de tipo P, establecen una diferencia de pH entre las dos caras de la membrana de entre 1,5 y 2 unidades, y son las responsables principales de un potencial de membrana de entre -120 y -200mV.

En *A. thaliana*, el eflujo de  $\text{Na}^+$  está mediado por el antiportador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de membrana plasmática SOS1 (65, 67, 68), presente en todos los tejidos de la planta, pero expresado en mayor medida en las células que rodean los vasos del xilema. Tiene por tanto un papel fundamental en el transporte de larga distancia (65), así como en el mantenimiento de los niveles de sodio citoplasmático (69–73). Adicionalmente, se ha descrito que SOS1 detoxifica el citoplasma de los tejidos inmaduros de la planta alrededor del ápice, donde no se ha desarrollado la endodermis completamente, suponiendo una línea de defensa fundamental de los tejidos vasculares en las regiones jóvenes de la raíz (65).

#### *Compartimentación de $\text{Na}^+$ y $\text{Cl}^-$ en la vacuola.*

Aunque se ha observado que el principal determinante de la tolerancia al  $\text{Na}^+$  en glicofitas es la exclusión de  $\text{Na}^+$  de la parte aérea (74, 75), la compartimentación del exceso de  $\text{Na}^+$  en la vacuola supone un mecanismo de tolerancia fundamental tanto en glicofitas como halofitas (69). Además del efecto detoxificador sobre el citosol, la acumulación de osmolitos minerales en el interior vacuolar es parte del proceso de expansión celular y el crecimiento (26). Existen distintas evidencias que indican que una mejora en la capacidad celular de compartimentación del  $\text{Na}^+$  en la vacuola suponen un incremento en la tolerancia salina de la planta (76, 77).

La membrana de la vacuola posee ATPasas de tipo V y pirofosfatasa que, mediante el consumo de ATP o PPi, generan un gradiente electroquímico a través de la misma, transportando  $\text{H}^+$  al lumen. Este hecho, junto a la presencia de transportadores de  $\text{Na}^+, \text{K}^+/\text{H}^+$  de la familia NHX en la membrana de la vacuola, llevó a postular un mecanismo similar al de la membrana plasmática, en el que un intercambio electroneutro de protones por  $\text{Na}^+$  al interior vacuolar serviría para detoxificar el citoplasma (78). Sin embargo, trabajos posteriores mostraron que los mutantes *nhx1 nhx2*, carentes de las dos isoformas mayoritarias en el tonoplasto de *Arabidopsis*, presentan un contenido en  $\text{Na}^+$  en la parte aérea de la planta incluso mayor que las plantas silvestres, lo que sugiere la existencia de otro mecanismo de inclusión del  $\text{Na}^+$

en la vacuola (79). Los principales efectores protéicos candidatos para la importación del  $\text{Na}^+$  a la vacuola son los transportadores de  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  de la familia CAX (por homología con el antiportador de levadura VNX1) (80, 81), o los canales no selectivos dependientes de voltaje (SV) (82), aunque ninguna de estas propuesta se ha sustanciado con un análisis genético.

Respuesta y mecanismos de homeostasis no-iónica de respuesta al estrés salino.

#### *Ajuste osmótico*

Como respuesta a las variaciones en el balance hídrico de la célula, los organismos vegetales acumulan metabolitos que actúan como osmolitos compatibles, esto es, que permiten restablecer el balance de concentraciones o cargas en los distintos compartimentos celulares sin interferir en la bioquímica fisiológica de la célula (26, 83).

Con unos límites variables dependientes de cada especie, las plantas acumulan osmolitos a una concentración proporcional al potencial osmótico externo, para así favorecer el flujo intracelular de agua y con ello la adaptación al estrés osmótico (84, 85).

Se han descrito distintas clases de osmolitos compatibles, como los azúcares (fructosa y sacarosa), alcoholes (glicerol, inositoles metilados), azúcares complejos (trehalosa, rafinosa, fructanos), metabolitos cargados (glicilbetaína), aminoácidos (prolina) e iones ( $\text{K}^+$ ) (26, 86).

#### *Respuesta antioxidante*

Las alteraciones en los procesos metabólicos producidas por los excesos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , provocan un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en

el interior celular, provocando daños oxidativos en todos los componentes celulares: membranas, proteínas y ácidos nucleicos (49, 87, 88).

Para reducir los niveles de ROS, la planta dispone de una serie de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la ascorbato peroxidasa (APX), la glutatión peroxidasa (GPX) o la catalasa. Estas enzimas actúan directamente sobre ROS (SOD, catalasa), o poseen sustratos que funcionan como agentes reductores como el ácido ascórbico o el glutatión (APX, GPX). Los organismos vegetales poseen múltiples genes que codifican para distintas formas de SOD y APX, localizadas en distintos compartimentos celulares, como los cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas, citosol y apoplasto (89, 90), lo que indica la relevancia de este control en el metabolismo de las células vegetales. Se ha observado que la sobreexpresión de enzimas detoxificadoras de ROS como son las GST y GPX en plantas de tabaco o de la Mn-SOD en plantas de arroz, provocaban una mejora en la tolerancia a la salinidad de las plantas transgénicas (91, 92), indicando la relevancia del control de ROS en la tolerancia a la salinidad.

Adicionalmente existen sistemas de control no enzimáticos, los tampones redox celulares, como el ascorbato y el glutatión, además del tocoferol, flavonoides, alcaloides y carotenoides. Estos compuestos se oxidan, aliviando los niveles de ROS, para posteriormente reducirse mediante enzimas que consumen NAD(P)H<sup>+</sup> como la glutatión reductasa, la monohidroascorbato reductasa o la dehidroascorbato reductasa. El mantenimiento de niveles tolerables de AsA/MDA+DHA y GSH/GSSG son esenciales para la tolerancia de la célula a la presencia de ROS (93).

Alternativamente a su naturaleza tóxica, los ROS poseen un papel señalizador en multitud de procesos metabólicos vegetales (incluida la tolerancia al estrés salino) (94, 95); este papel se tratará en detalle más adelante.

### [Sensores y vías de señalización de la respuesta halotolerante.](#)

Los cambios específicos en la expresión de genes, metabolismo y fisiología que se observan en los distintos organismos vegetales frente a la salinidad y los estreses

que provoca, (osmótico, iónico y oxidativo), indican que las plantas poseen mecanismos de percepción de las señales ambientales asociadas a una situación de estrés (95). Estas señales generan una cascada de moléculas específicas, que son detectadas e interpretadas por distintas familias de proteínas, que, mediante una red de interacciones, ponen en marcha la respuesta de tolerancia.

## Mensajeros secundarios y metabolitos señalizadores de la respuesta al estrés salino

### *El calcio*

El catión calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) posee un papel destacado en la respuesta celular al estrés. Las variaciones de la concentración del catión en el citoplasma de la célula ponen en marcha, detienen y modulan multitud de procesos metabólicos relacionados con la respuesta a estímulos.

El  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático se mantiene en una concentración natural de alrededor de los 200 nM (96), y diferentes estímulos pueden modificar esta concentración, ya sea por entrada desde el apoplasto, o por liberación desde orgánulos como la vacuola o el retículo endoplasmático (96–98). Este incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  es transitorio y su reabsorción se encuentra regulada muy finamente tanto temporal como espacialmente (95), lo que permite controlar la naturaleza, intensidad y la duración de la señal (99). La reabsorción del  $\text{Ca}^{2+}$  se produce mediante su unión a proteínas en el citoplasma o su devolución mediante transporte activo al espacio apoplástico u orgánulos (100).

Entre las proteínas implicadas en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma se han descrito canales mecano-sensibles como OSCA1 o MSL8, cuya apertura está regulada por cambios de tensión en la membrana plasmática provocados por el estrés osmótico (y otros estreses), lo que induce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular desde el apoplasto (101, 102). Alternativamente a estos canales-sensores, las familias de proteínas CNGC (*Cyclic Nucleotides-Gated Channels*) y GRL (*GLutamate Receptor-like*), presentes en las membranas plasmática, del retículo y tonoplasto, podrían mediar la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  regulada por voltaje o por señalización bioquímica (95, 103).



La reabsorción del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático es un proceso activo que se realiza mediante el transporte por ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P, presentes en la membrana plasmática (ATPasas tipo IIB) o en el retículo endoplasmático (ATPasas tipo IIA) (104, 105). La recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el tonoplasto está mediada por antiportadores  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  de la familia CAX (106). Se ha observado también que los canales vacuolares de tipo TCP1 podrían tener un papel en este proceso (107). El canal TCP1 de *Arabidopsis* no parece transportar  $\text{Ca}^{2+}$  directamente, pero se encuentra implicado en el control de las señales de este catión (108).

Múltiples familias de proteínas implicadas en la respuesta al estrés salino responden a la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$ . Las *Calcium Dependent Protein Kinases* (CDPK), las *Calmodulin-B-Like proteins* (CBL) y sus interactores las proteínas quinasas de tipo CIPK (*CBL-Interacting Protein Kinase*) son fundamentales por su función netamente reguladora, pero otros aspectos de la respuesta al estrés también se encuentran modulados por  $\text{Ca}^{2+}$ , como la NADPH oxidasa RBOHF (109).

Las CDPK (*Calcium-Dependent Protein Kinase*), son quinasas de serina/treonina, con cuatro dominios EF carboxiterminales similares a los de calmodulina, lo que les permite unir  $\text{Ca}^{2+}$ . Este tipo de quinasas suponen un mecanismo integrado sensor-elector. Dentro de la familia existen diferentes umbrales de activación por  $\text{Ca}^{2+}$  y diferentes afinidades por sustratos, lo que determina la acción específica de cada miembro. Además de su papel en la respuesta a estrés abiótico, estas quinasas también participan en la señalización de otros procesos metabólicos de la planta (110).

Las CBL (*calcineurin-B-like*), son pequeñas proteínas conformadas por 4 dominios “EF-hand” de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , emparentados con la subunidad reguladora de la calcineurina de la fosfatasa calcineurina (CNB) y con los sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  neuronales NCS (*Neuronal Calcium Sensor*) (111). Estas proteínas no poseen una actividad catalítica propia, ejerciendo su actividad reguladora/señalizadora mediante la interacción con otras proteínas. Los interactores mejor descritos de las proteínas CBL en *A. thaliana*, son las quinasas de la familia CIPK (*CBL-Interacting Protein Kinase*). La unión CBL-CIPK, produce la activación y migración al sitio de acción de la quinasa. La existencia de 10 CBLs y 26 CIPKs en *Arabidopsis* generan un abanico de interacciones

que abarcan distintos procesos de respuesta al  $\text{Ca}^{2+}$  en distintos tejidos y momentos del desarrollo de la planta (112).

Debido a su relevancia en este trabajo, la naturaleza del funcionamiento y regulación de las proteínas CIPK se tratará con mayor detenimiento más adelante en esta memoria.

### *Especies reactivas de oxígeno (ROS)*

Como se ha mencionado anteriormente, la producción descontrolada de ROS por disrupciones en el funcionamiento de la maquinaria celular debido a algún tipo de estrés, supone un grave riesgo para la integridad celular, debido al carácter altamente reactivo y el daño en cadena que pueden provocar procesos como la peroxidación de componentes celulares. Sin embargo, los radicales libres también pueden ser señal intra e intercelular de los organismos vegetales.

Las NADPH oxidasas son complejos enzimáticos de membrana plasmática de la familia NOX, que en plantas se han llamado RBOH (*Respiratory Burst Oxidase Homologue*). Estos complejos se activan mediante un espectro de señales reguladoras, iniciando un proceso de producción del anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) en el espacio apoplástico celular. En *Arabidopsis* existen 10 NADPH oxidasas llamadas AtRBOHA-J que se activan transcripcional y postraduccionalmente en respuesta al estrés salino (113). Concretamente AtRBOHD y AtRBOHF son críticas en la tolerancia al estrés por  $\text{Na}^+$  (114, 115). Esta liberación controlada de ROS puede tener varias consecuencias conocidas: la estabilización del ARN de *SOS1* (116), la iniciación de la ola señalizadora de  $\text{Ca}^{2+}$  (117), y una posible modulación de la respuesta al estrés salino mediante su interacción con canales NSCC.

Recientemente se ha propuesto un mecanismo de iniciación de la respuesta al estrés salino en el que un dominio de membrana plasmática de tipo *lipid raft* donde conviven NSCCs, CNGCs y RBOHs (118). La entrada de  $\text{Na}^+$  por canales de tipo NSCC induciría un rápido descenso del potencial de membrana local, lo que induciría la

entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esa entrada inicial se percibiría por las EF-hands del C-terminal citoplasmático de la RBOH, lo que dispararía la producción de ión superóxido apoplástico. Este compuesto sería transformado en peróxido de hidrogeno rápidamente por las superóxido dismutasas extracelulares, lo que induciría una segunda entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  local por parte de los NSCC-dependientes de ROS, induciendo así un bucle de auto-activación que provocaría respuestas aguas abajo, como el aumento de cNMPs necesarios para la activación de los CNGCs (118).

Este mecanismo de regulación retroalimentado que conforman el  $\text{Ca}^{2+}$  y los ROS se encuentra a su vez conectado con otros elementos reguladores del metabolismo celular como son los lípidos señalizadores de membrana y las fitohormonas. La regulación de todos estos mecanismos de regulación/señalización se encuentra finamente interrelacionada, teniendo todos ellos efectos en la producción, modulación y represión del resto, lo que permite un control de los mecanismos rápido y preciso.

### *Lípidos de membrana*

Adicionalmente a su función estructural, los lípidos de membrana funcionan como sustrato para la formación de compuestos señalizadores citosolubles. Los glicerofosfolípidos o el diacilglicerolfosfato presentes en alguna membrana celular (generalmente la membrana plasmática) pueden sufrir diferentes transformaciones químicas, dando lugar una variada serie de compuestos solubles que cumplen una función señalizadora. Los compuestos producidos activan procesos adaptativos frente al estímulo inductor, incluido el control de la activación de grupos de genes y la asociación a proteínas y metabolitos, reclutándolos a diferentes membranas, modificando así su localización, conformación y actividad (119, 120).

Los principales efectores enzimáticos de la modificación química de los fosfolípidos son: La fosfolipasa D (PLD), encargada de la hidrólisis del fosfatidilinositol (PI) en ácido fosfatídico (PA) y la fosfolipasa C (PLC), que produce diacilglicerol (DAG). Las fosfatidilinositol quinasas (PIK), encargadas de la fosforilación del PI para la

producción de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>). Por último, las fosfolipasas A (PLA<sub>1</sub> y PLA<sub>2</sub>), median la hidrólisis del PI fosforilado en lisofosfolípidos o ácidos grasos libres (*Free Fatty Acids*, FFA). Adicionalmente a este corpus fundamental de enzimas, existen otras que permiten modificaciones en la composición del conjunto de lípidos: la diacilglicerol quinasa (DGK) y la ácido fosfatídico fosfatasa (PAP), modifican el estado de fosforilación que diferencia el PA del DAG. La lipooxigenasa (LOX) y las oxidasa sintasa y ciclasa (AOS/AOC) transforman los FFA en oxilipinas (119)

La producción de compuestos lipídicos señalizadores es un elemento central de la respuesta de la planta al estrés osmótico y salino. El ácido fosfatídico (PA) es el elemento señalizador más importante en esta respuesta. El PA se origina por dos rutas: la regulada por la fosfolipasa D, mediante la hidrólisis de fosfatidilcolina o fosfaditiletanolamina, y la regulada por la fosfolipasa C, en la que de la hidrólisis de intermediarios activados del fosfatidilinositol produce DAG, que es posteriormente fosforilado hasta PA por la DGK (120–123). El estudio de estas rutas en la respuesta al estrés biótico ha mostrado que mientras la respuesta PLC/DGKs se produce como parte de la respuesta inicial al estrés, la ruta PLD se activaba posteriormente y de una manera más sostenida en el tiempo (horas), indicando una funcionalidad diferente para cada una de las rutas, a pesar de producir la misma molécula señalizadora (122, 124).

Los lípidos señalizadores poseen un rol central en la respuesta al estrés salino, pudiendo diferenciarse diferentes respuestas dependiendo del componente hídrico, osmótico o salino del estrés. El PA es el principal efector de esta respuesta, aunque se ha observado que otros lípidos se producen y modulan estos procesos, siendo difícil diferenciar el papel específico de cada uno en el resultado final (119).

La producción de PA inducida por estrés hídrico (125) parece fundamental en el proceso de cierre estomático: El aumento de las concentraciones de PA citoplasmático provoca una adhesión del compuesto a la fosfatasa ABI1, lo que provoca su transporte y fijación a la membrana plasmática, inhibiendo su translocación nuclear e impidiendo la activación del factor de transcripción AtHB6, encargado de la represión de la respuesta al ABA (126). El PA también parece tener un papel en la señalización por ROS

y óxido nítrico (127, 128), se ha observado que el PA se une a las NADPH oxidasas RBOHD y F, activándolas e induciendo la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apoplástico en la señalización del cierre estomático. (129)

Otras funciones del PA en la respuesta al estrés hídrico son el aumento de la expresión de las dehidrinas y su adhesión a las mismas, lo que modifica su conformación, promoviendo la formación de estructuras  $\alpha$ -hélices que facilitan la estabilidad estructural de otras macromoléculas (130).

La señalización por lípidos es también parte fundamental de la tolerancia al estrés salino y osmótico (131). Tanto el PA, el PI y las oxilipinas aumentan en presencia de estrés salino, induciendo importantes cambios en el metabolismo, modificaciones en la arquitectura de la raíz y reorganizaciones del citoesqueleto (119).

Se ha observado que, en presencia de un estrés salino, el PA se une e induce la degradación de las enzimas gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, mediadora de la glucólisis (132, 133), y la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) implicada en el metabolismo fotosintético C<sub>4</sub> (134). En el caso de la GAPC, se ha observado que esta modificación se ve favorecida por el tratamiento con ROS y que posee un efecto indirecto sobre el control del crecimiento de la raíz primaria (132, 135).

El PA también es capaz de inhibir y promover la degradación a las proteínas SnRK2 uniéndose a un dominio específico C-terminal, lo que provoca una movilización dentro de la célula y su degradación mediada por proteínas auxiliares. Este proceso se induce rápidamente (pocos minutos) en presencia de un estrés salino (136, 137).

Se ha observado que el PA se asocia con clatrininas, indicando un papel en la formación de vesículas y tráfico de membrana en presencia de sal (138). Adicionalmente, se ha observado que los mutantes *pld $\alpha$* , con producción reducida de PA, presenta problemas en la reorganización del citoesqueleto de actina en presencia de estrés salino (139, 140). También se ha observado que la actividad de la proteína MAP65-1, implicada en la estabilización de microtúbulos adyacentes, aumenta al añadir PA exógeno en condiciones de estrés salino (140)

La producción de PA (concretamente la especie 16:0 – 18:2), aumenta la actividad de la proteína quinasa MPK6 mediante la unión directa del lípido a la proteína. Esta unión es específica del PA y no se produce con otras especies como PC o DAG. Se ha observado también que la sal impide la germinación del mutante *plda1*, y que este efecto depende del componente iónico del estrés salino (141).

## Proteínas y rutas metabólicas implicadas en la respuesta al estrés abiótico

### Proteínas MAPKs

Las MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) constituyen una familia de quinasas de serina/treonina conservadas en todos los organismos eucariotas. Su función es la señalización intracelular de la respuesta a señales ambientales y del desarrollo.

Se caracterizan por su funcionamiento en estructuras modulares conformadas por al menos tres quinasas, MAP3K (MAP2K kinases), MAP2K (MAPK kinases) y una MAPK, que fosforila al sustrato final de la cascada. La interacción y formación de un complejo del módulo trimérico de MAPKs requiere de la fosforilación secuencial de cada elemento de la misma por el anterior. El acoplamiento y actividad pueden estar también regulados o facilitados por otros elementos externos, como proteínas de andamiaje (*scaffolding*), tales como receptores de membrana. Adicionalmente, existe una familia de fosfatasa de MAPKs involucradas directamente en la defosforilación e inactivación de los complejos MAPK, además de otras familias de fosfatasa de la familia PP2C capaces de interactuar con las proteínas MAPK (142).

La secuenciación del genoma de *A. thaliana* mostró que esta especie cuenta con 20 MAPKs, 10 MAP2Ks y 80 MAP3Ks, una distribución del número de componentes de cada tipo frecuente en esta familia de proteínas (143). Las MAPKs y MAP2Ks de *Arabidopsis* poseen una estructura y mecanismo de actividad similar a las de otros organismos eucariotas y se clasifican en cuatro grupos dependiendo de su secuencia y estructura (grupos A-D) (143). Las MAP3Ks sin embargo, conforman un grupo heterogéneo (144), que puede dividirse en tres grandes categorías, las MEKK

(*MAPK/ERK kinase kinase-like MAP3K*), que ejercen la función de MAP3K clásica del resto de eucariotas (como MEKK1 de mamíferos o STE11 en levaduras), y las subfamilias Raf-like (similares a RAF1 de mamífero) y ZIK-like. Estos dos grupos se encuentran clasificados filogenéticamente junto al resto de proteínas MAP3K pero no se ha encontrado ningún caso de fosforilación de MAP2K por parte de estas proteínas (142).

Las MAP2K conforman el grupo menos numeroso de proteínas de la cascada. Este menor número de MAP2K es consistente entre todas las especies del reino vegetal, lo que sugiere que la misma MAP2K debe estar implicada en más de una cascada señalizadora mediada por MAPKs (145). Se ha observado que la cercanía filogenética de los módulos implica también una cercanía funcional (145), siendo, por ejemplo, MKK1 y MKK2 (grupo A) activadoras de MPK4 (146); o MKK4 y MKK5 (grupo C) las que activan de manera redundante a MPK3 y MPK6 (147). Aunque el mecanismo encargado de determinar la especificidad de estas interacciones no se conoce profundamente, el estudio de las diferencias en la secuencia de las distintas MAP2K implicadas en el proceso de diferenciación estomática ha permitido la identificación de hipotéticos dominios de anclaje en el N-terminal del dominio quinasa que determinarían la especificidad de la interacción (148).

Las MAPKs de *Arabidopsis* se subdividen en 4 grupos filogenéticos (grupos A-D) (143). Los grupos A, B y C presentan un dominio de tipo TEY en su lazo de activación (sitio TxY), mientras que las del grupo D presentan un dominio TDY. Los lazos TxY de tipo TDY/TEY se encuentran presentes en las proteínas ERK animales, difiriendo las MAPK vegetales de los motivos presentes en otras MAPK eucariotas: TGY (p38, Hog1) y TPY (JNK-MAPK)(145).

Todas las proteínas de la familia MAPK de *Arabidopsis* presentan similitudes estructurales conservadas en todo el conjunto de la familia: se ha observado que la sustitución de la lisina localizada en el sitio de fosfotransferencia del dominio catalítico N-terminal de las proteínas, permite obtener mutante inactivos que son capaces de unir ATP (147, 149). También presente en el N-terminal se encuentra el ya mencionado lazo de activación (*T-loop*) por parte de las MAP2K, con una secuencia TxY; la



sustitución de cualquiera de estos aminoácidos produce una proteína inactiva (145). Diversos estudios en *Drosophila melanogaster* (Rolled) y *Saccharomyces cerevisiae* (FUS3, HOG1) han demostrado que no existen residuos conservados que produzcan una conformación constitutivamente activa en estas proteínas al ser mutados (150–152). Sin embargo, cada MAPK presenta distintos aminoácidos que al modificarse producen una proteína constitutivamente activa (153). Las MAPK de las familias A, B y C presentan en su C-terminal un dominio conservado denominado CD (de *common docking*), que funciona como sitio de anclaje para MAP2Ks, fosfatasa y otros sustratos proteicos. El dominio CD tiene una secuencia [LH][LHY]Dxx[DE]xx[DE]EPxC, en la que los dos sitios ácidos DE son fundamentales para la interacción con el grupo de aminoácidos básicos (lisinas y argininas) presentes en las MAP2Ks. De igual modo, los residuos hidrofóbicos L, H e Y, interaccionan con un sitio [LxLxL], también en las MAP2Ks (154). Las MAPK pertenecientes a los grupos C, presentan un dominio CD con una estructura parcialmente diferente a las de los grupos A y B, y las MPK del grupo D no presentan dominio CD (143). Es interesante destacar que la mayoría de interacciones y funciones conocidas de las MAPK pertenecen a proteínas de las subfamilias A y B, sugiriendo un posible mecanismo de acción diferente a la interacción proteína-proteína o proteína-quinasa para las MAPK de las familias C y D.

El estudio de la activación y diana de las cascadas de proteínas MAPK ha mostrado un abanico de funciones transversal y muy robusto a través de todo el metabolismo celular, siendo capaces de activar, desactivar y modular respuestas de todo tipo, muchas veces opuestas, ante diversos estímulos ambientales y del desarrollo.

Los mecanismos de regulación mejor descritos en plantas dentro de la ruta MAPK son los de respuesta al estrés biótico. Receptores de membrana de tipo RLK (*Receptor Like Kinase*) se unen a PAMPS (*Pathogen Associated Molecular Patterns*), generalmente péptidos o componentes de la pared celular comunes a diferentes organismos patógenos. Este reconocimiento dispara una cascada de señalización que conlleva el aumento de la transcripción de multitud de genes de respuesta antimicrobiana y la producción de ROS. Las particularidades de la defensa ante patógenos se escapan del objetivo de esta Memoria, pero es interesante destacar que entre otras

respuestas señalizadoras, la interacción entre patógenos y proteínas MAPK pueden provocar el aumento de la producción o la modificación de los niveles de ácido salicílico, etileno y ácido jasmónico (vía regulación de su síntesis y degradación), procesos programados de muerte celular y el SAR (*Systemic Acquired Resistance*), esto es, la activación en tejidos no afectados de la planta de mecanismos de prevención de la infección vía regulación de la expresión génica y modificación de actividades de proteínas (142).

La cascada modelo de respuesta al estrés biótico es la activada por el PAMP flagelina 22 (flg22). Este péptido, producido por diversos organismos patógenos móviles, es reconocido por el complejo receptor-quinasa conformado por FLS2 (*Flagelin Sensing 2*) y BAK1 (*BRI1-Associated Kinase 1*) (155). Una vez activado el complejo, se inicia una serie de respuestas celulares, que incluyen una explosión oxidativa (*oxidative burst*) (156), la modificación de la actividad de múltiples quinasas y la consecuente modificación del estado de fosforilación de proteínas (157), produciendo modificaciones en la expresión de multitud de genes (158).

Las tres quinasas aguas abajo de esta ruta señalizadora son MPK3, MPK4 y MPK6 y su activación se produce 5 minutos después del tratamiento con flg22, incluso en presencia de inhibidores de la traducción, lo que indica una unión directa entre el complejo sensor y la ruta MAPK (147). La disección genética de los mutantes implicados en la respuesta a flg22, además de estudios de bioquímica y de expresión en protoplastos, apuntó a la existencia de dos rutas independientes y redundantes: la conformada por MEKK1 (MAP3Ks), MKK1/MKK2 (MAP2Ks) y MPK4 (MAPK) y la conformada por MEKK1 (MAP3K), MKK4/MKK5 (MAP2K) y MPK3/MPK6 (MAPKs). Los sustratos aguas debajo de estas dos rutas son enzimas de biosíntesis de hormonas, sustancias antibacterianas y factores de transcripción (149, 159). Es destacable que mientras la ruta formada por MKK4-MKK5-MPK3/MPK6 induce procesos de defensa celular, la conformada por MKK1-MKK2-MKK4 supone un regulador negativo de esta respuesta, indicando que la respuesta final a este estímulo depende de otros factores externos a la ruta MAPK que determinaran la decisión final de la célula (142, 145). Por ejemplo, la fosfatasa AP2C1 ha sido descrita como elemento regulador de tanto MPK6 como MPK4 (160).

Un elemento común de la respuesta a los estreses biótico y abiótico, que engloba la actividad de las MAPK, es la producción de ROS como respuesta temprana a la presencia de un estrés. Se ha descrito que el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de protoplastos de *Arabidopsis* es capaz de activar tanto a MPK3 como a MPK6 vía activación de ANP1/MAP3K01, probablemente mediante la activación de MKK4 o MKK5 (161, 162). Este proceso de activación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoca nuevas oleadas de producción de ROS, produciendo un bucle de retroalimentación positiva (162), que es modulado por otras enzimas, como la NDP quinasa 2 (163) o OXI1 (164). También se ha observado que MEKK1 es capaz de activar a MPK4 en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (162) y que casi todas las MAPKs de tipo C (MPK1, MPK2 y MPK7) son activadas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vía MKK3. Es destacable señalar que además de activarlas, las ROS tienen la capacidad de estabilizar los complejos de MAPKs (como se ha observado en los casos de MEKK1-MKK3-MPK4) (162, 165). La producción de ROS también induce la actividad de proteínas reguladoras de la actividad de las MAPK, como la fosfatasa MKP2, capaz de defosforilar a MPK3 y MPK6 en el núcleo, modulando la respuesta final de la ruta (166, 167).

Como se ha mencionado previamente, este proceso de síntesis de ROS está mediado por proteínas de tipo RBOH (tipo D y F). Estas proteínas presentan distintos mecanismos de activación que varían en el tiempo dependiendo del estado y tipo de estrés producido, pudiendo ser activadas por PA, Ca<sup>2+</sup> y fosforilación (118, 131). El estudio de la regulación por fosforilación de las proteínas RBOH mostró que los sitios de fosforilación implicados en su activación estaban formados por sitios serina-glutamina, no fosforilables por MAPK (dianas serinas/treoninas-prolina), por lo que la activación de las MAPK debe producirse aguas abajo del proceso de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (142). Experimentos con el PAMP pep13 mostraron que la cascada MAPK, resultado del tratamiento con el péptido, no podía reprimirse mediante el tratamiento con inhibidores de la NADPH oxidasa, lo que indica la existencia de rutas de activación de las MAPK independientes de la iniciación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (168, 169).

Además de responder a PA, ROS y el Ca<sup>2+</sup>, las MAPK están implicadas en la respuesta a distintas fitohormonas, coherentemente con su papel en la modulación de procesos de respuesta a estrés y desarrollo. Se puede apreciar que todos los mecanismos implicados en la respuesta al estrés tienen un papel fundamental en el

desarrollo y viceversa. Este fenómeno tiene una relevancia especialmente marcada en las plantas, pues su arquitectura y gestión de procesos y recursos está muy determinada por la respuesta al exterior.

Múltiples cascadas MAPK responden a ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA), ácido salicílico (SA), etileno (ET), auxinas y brasinoesteroides. Estas moléculas pueden participar en más de una ruta de señalización, lo que añade una capa de complejidad adicional al proceso de coordinación de la respuesta.

El ABA está implicado en la adaptación de la planta a condiciones ambientales desfavorables, incluyendo sequía, salinidad, frío y ataques de patógenos. El tratamiento de *Arabidopsis* con ABA induce la producción y activación de las catalasas CAT, implicadas en el control de los niveles  $H_2O_2$  producidos por el tratamiento con la hormona (170). MKK1 es la encargada de esta activación vía reclutamiento y activación de MPK6, regulando, entre otros procesos, el control del cierre estomático (171, 172). También se ha observado que los mutantes *mpk3* son incapaces de inhibir la apertura de los estomas mediada por ABA/ $H_2O_2$  (173). Un estudio de proteómica ha determinado que múltiples MAPKs se encuentran activas e implicadas en el control de apertura y cierre de los estomas mediado por ABA (MPK4, MPK9, MPK12, MPK15 y MKK2) (174). Recientemente se ha descrito la ruta de señalización MKKK20-MKK5-MPK6 inducida por ABA. Los mutantes *mkkk20*, *mkk5* y *mpk6* presentan un control estomático comprometido y no pueden inhibir el crecimiento de la raíz en presencia de sal o ABA (175).

El etileno, hormona reguladora del desarrollo y de la respuesta al estrés, es capaz de unirse a los receptores histidina quinasa ETR1 y ETR2, presentes en la membrana del retículo endoplasmático. Esta unión provoca la inhibición de la MAP3K de tipo Raf, CTR1, induciendo la activación del complejo MKK9-MPK6/MPK3, que migra al núcleo e induce la respuesta transcripcional mediante la fosforilación de EIN3 (176). También se ha descrito que MKK4/MKK5-MPK6 activan a ACS6 y ACS2, enzimas implicadas en la síntesis de ET. Este mecanismo muestra como la variedad en la interacción entre MAPKs y MAP2Ks puede modificar completamente la regulación y el sustrato final de la cascada señalizadora: mientras que MKK4 mantiene a MPK6/MPK3

en el citoplasma, la interacción con MKK9 supone una migración al núcleo de las mismas, induciendo dos procesos diferenciados (177).

El estudio de la respuesta de las MAPK de *Arabidopsis* a condiciones de estrés ambiental han mostrado que variaciones de temperatura, un aumento de la concentración de ozono, presencia de ROS, la radiación UV, la sequía, la salinidad y la respuesta fitohormonal activan cascadas de señalización MAPK. Como se ha mencionado previamente, muchos de estos procesos provocan respuestas moleculares similares o idénticas, por lo que es difícil desentrañar las especificidades de cada proceso, si es que estas existen.

La ruta de señalización más conocida dentro de la respuesta MAPK al estrés abiótico fue descrita por Teige et al. (178). En plantas de *Arabidopsis* sometidas a tratamientos de bajas temperaturas o sal, se observó una activación de MKK2 y su acoplamiento con MPK4 y MPK6, provocando una activación de las MAPK e induciendo la expresión de genes de respuesta al frío y la salinidad. Esta ruta es fundamental en la tolerancia de la planta, ya que los mutantes *mkk2* presentan una fuerte sensibilidad a ambos estreses. La búsqueda por doble híbrido de la MAP3K aguas arriba de esta ruta, apuntó a MEKK1. El estudio temporal del proceso de activación de MPK4 y MPK6 por MKK2 indicó que mientras MPK6 actúa rápidamente tras la aplicación del estrés (10 minutos), MPK4 presenta una activación tardía (60 minutos) (179). Los mecanismos de percepción de los estreses por salinidad o bajas temperaturas son muy similares, liberación de calcio al citoplasma, activación de histidina-quinasas y producción de PA y PI, rutas que rápidamente convergen en la activación de CDPKs, MAPKs y CIPKs (95, 170).

Los mecanismos regulados por salinidad dentro de la ruta MAPK incluyen la MAP3K de tipo Raf-like, DSM1 (*Drought hyperSensitive Mutant 1*) de arroz (180), MKKK20 en *Arabidopsis* (mencionada previamente en la respuesta al ABA) (181), o MEKK1, cuyos mutantes poseen un fenotipo de tolerancia a la salinidad, lo que sugiere un papel de regulación negativa (182). MKK2 y MKK9 activan distintas MAPKs en respuesta al estrés salino; MKK2 activa a MPK4 y MPK6 (178) y MKK9 a MPK3 y MPK6 (183). Además, presentan papeles opuestos en la respuesta al sodio (*mkk2* es sensible

a sal, mientras que *mkk9* es tolerante). Se ha descrito que el estrés salino e hiperosmótico producen la activación de MPK3, MPK4 y MPK6, aunque solo se conocen dianas de ésta última. MPK6 fosforila a SOS1 rápidamente (10 minutos) tras el tratamiento con NaCl (141) y posteriormente fosforila el factor transcripcional ZAT6, implicado en la respuesta al estrés salino e hiperosmótico (184).

Al igual que el estrés salino, el estrés hídrico induce la producción de ROS y PA dependiente de PLD. Estos procesos, junto a la producción posterior de ABA, conducen a la activación temprana y a medio plazo de rutas MAPK implicadas en el control del cierre estomático y la regulación de factores de transcripción WRKY y BZIP (*Basic leucine Zipper*). Algunas de las MAPK implicadas en este proceso son MPK9, MPK12, MPK6 o MKK4 (170)

#### MPK3, MPK4 y MPK6.

Como se describe en el apartado anterior, MPK3, MPK4 y MPK6 se encuentran presentes en la mayoría de procesos de respuesta a estrés regulados por cascadas MAPK. MPK3, MPK4 y MPK6 se activan en presencia de sal, bajas temperaturas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, estrés osmótico, ABA y Ca<sup>2+</sup>. Aunque los patrones de expresión de las tres quinasas difieren dependiendo del tejido, tratamiento o estadio del desarrollo (185), las tres proteínas coexisten en múltiples tejidos y poseen papeles coordinados en situaciones de crecimiento normal y como respuesta a estímulos (142, 145, 170). La redundancia funcional es especialmente marcada entre MPK3 y MPK6. El alineamiento de ambas proteínas indica un 76% de identidad, con un 88% de aminoácidos conservados (186). Un estudio de proteómica identificó 48 sustratos de MPK3 y 39 de MPK6, de los cuales 26 son comunes a ambas proteínas (187). El modo de acción específico de cada una de estas proteínas depende por tanto de sus interactores aguas arriba, que determinan su acción, y de su disposición subcelular, discriminando el objetivo no solo de cada una de estas proteínas sino de diferentes subpoblaciones de una sola proteína dentro de cada célula (142).

El estudio de la estructura y regulación de SOS1 ha mostrado que en su C-terminal existen múltiples sitios putativos de fosforilación por MAPK. Aunque se desconoce si estos sitios tienen un papel biológico determinante en la actividad de la proteína en general o en la tolerancia de la planta al estrés salino en particular, el conjunto de evidencias que existen acerca de las proteínas MAPK indican que es muy posible la comunicación entre las rutas MAPK y SOS. Resultados previos de nuestro grupo han mostrado que una MAPK puede ser responsable, junto a SOS2, de la activación de SOS1 por fosforilación de su C-terminal. Este hecho junto a la evidencia de que MPK6 es capaz de fosforilar a SOS1, y que MPK6 y MPK4 están implicadas en la respuesta al estrés salino, nos han llevado a interesarnos por el papel regulatorio concreto de esta familia de proteínas en la ruta SOS.

#### *Proteín quinasas SnRK*

La familia SnRK (*Snf1-related protein kinases*), son un grupo de proteínas presentes en el reino vegetal encargadas de la regulación y señalización de procesos metabólicos y de respuesta al estrés. Emparentadas filogenéticamente con las proteínas SNF1 (*Sucrose-Non Fermenting 1*) de levadura y AMPK (*AMP-activated Protein Kinases*) en animales, las SnRK vegetales presentan similitudes estructurales y funcionales con ambas, pero también numerosas y significativas diferencias en su regulación, funcionamiento y diversidad.

Las SnRK de *Arabidopsis* se dividen en tres subfamilias, SnRK1, SnRK2 y SnRK3. Las proteínas de la subfamilia SnRK1 son las más similares a SNF1 y también presentan una función en la señalización energética de la planta (188). Las subfamilias SnRK2 y SnRK3 son específicas de plantas y forman parte de rutas de señalización implicadas con la respuesta al estrés abiótico y al ABA (189–191).

Las SNF/AMPK/SnRK poseen dos dominios diferenciados en todos los miembros de la familia, un N-terminal quinasa catalítico y un C-terminal regulador. Mientras el dominio N-terminal se encuentra conservado entre las diferentes proteínas de la familia (42-45% de identidad) (192), el C-terminal presenta marcadas diferencias. Esta



naturaleza binaria de su estructura tiene una importante repercusión regulatoria: la regulación sobre la actividad que tiene lugar en el dominio C-terminal es muy variable entre distintas subfamilias y genera las diferencias en la identidad de la ruta regulatoria y en la sensibilidad a las señales de cada proteína, lo que determina la especificidad e intensidad de su actividad. La regulación que se da en el N-terminal, sin embargo, es común a todos los miembros de la familia y supone, con matices, un mecanismo de *switch* en la actividad de la proteína (192, 193).

### SnRK1

Las proteínas de la familia SnF1/AMPK/SnRK1 son ortólogos presentes en hongos, animales y plantas, que responden a señales de estrés o cambios en el balance energético del organismo, esto es, actúan en la interfaz entre metabolismo y estrés. Las AMPK se activan en situaciones de baja disponibilidad o de alta demanda de glucosa, en respuesta a choques térmicos, inhibición del metabolismo oxidativo o reducción del suministro de oxígeno. La actividad de SNF1 se induce en ausencia de glucosa y activa todos los mecanismos metabólicos relacionados con la respiración, la producción de mitocondrias y peroxisomas, inhibiendo el consumo preferencial de glucosa mediante fermentación. SnRK1 regula en *Arabidopsis* la actividad de distintas enzimas implicadas en el metabolismo del azúcar, como la HMG-CoA reductasa, sacarosa fosfato sintasa, la nitrato reductasa, la trehalosa fosfato sintasa o la 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa. SnRK1 posee un efecto inhibitor sobre la actividad de estas enzimas, mediada por la asociación con una proteína 14-3-3 (192).

La regulación de SNF1, AMPK y SnRK1 se produce mediante la formación de complejos heterotriméricos. El N-terminal catalítico conforma lo que se denomina subunidad  $\alpha$ , y mediante la unión a las diferentes subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ , se modula sus niveles de actividad y dianas (194). Mientras que la subunidad  $\gamma$  de AMPK regula la actividad mediante la percepción de los niveles de AMP/ATP (195), la actividad de SNF1 no responde a los niveles de AMP celulares, siendo desconocido el mecanismo molecular por el que SNF1 es activado. La regulación heteromérica de SnRK1 presenta

diferencias con respecto a sus homólogos animales y fúngicos. Además de no responder a los niveles de AMP, su lazo de activación (llamado *T-loop* en la literatura) no es defosforilado por fosfatasas como el resto de miembros de la familia en animales y plantas, posee una subunidad binaria  $\beta\gamma$  (resultado evolutivo de la fusión de los dominios  $\beta$  y  $\gamma$ ), y su dominio  $\beta$  no es capaz de unir carbohidratos (196).

En el reino vegetal, las SnRK han expandido sus morfologías y funciones, existiendo dos subfamilias únicas en plantas, denominadas SnRK2 (10 miembros) y SnRK3 (26 miembros). La homología entre SnRK1, Snf1 y AMPK es mayor que la de SnRK1 con las proteínas de tipo SnRK2 o SnRK3, debido fundamentalmente a las diferencias entre los dominios C-terminal reguladores (112, 113).

## SnRK2

Los estudios de esta subfamilia de SnRKs han mostrado que estas proteínas están implicadas fundamentalmente en la respuesta al estrés hídrico, maduración del embrión y germinación (mayoritariamente mediados por ABA), además de estar implicadas en la regulación del desarrollo de la raíz en situaciones de estrés.

En *Arabidopsis* existen 10 SnRK2 y están divididas en tres grupos, que responden a su homología y a su capacidad de activarse por ABA. Los miembros del grupo I son insensibles a la hormona, y los del grupo II y III poco o muy sensibles respectivamente. La expresión en protoplastos de las quinasas de esta subfamilia han demostrado que todos sus miembros (excepto SnRK2.9) inducen su actividad en respuesta a osmolitos (manitol, sacarosa, sorbitol) o NaCl, sugiriendo que la familia tiene un papel general en la respuesta al estrés osmótico (mediado por ABA o no) (197, 198).

Las SnRK2 son quinasas monoméricas, de tipo serina/treonina (199, 200). Su estructura la conforman un dominio N-terminal catalítico y un dominio regulador C-terminal, dividido a su vez en dos subdominios I y II. El dominio I es común a todas las quinasas de la subfamilia y está implicado en la activación por estrés osmótico. El dominio II solo está presente en las SnRK2 activadas por ABA (201) y está relacionado

con su interacción con fosfatasa de tipo PP2C, que al unirse a este dominio pueden acceder al *T-loop* N-terminal e inhibir la actividad quinasa (201, 202, 206). Esta interacción está regulada negativamente por las proteínas receptoras ABA del tipo RCAR/PYR/PYL, que en presencia de la hormona secuestra a las PP2C permitiendo la actividad de las SnRK2 de tipo III. También ha sido descrito como regulador de las SnRK2 la proteína sensora de calcio SCS (*SnRK2-interacting Calcium Sensor*), capaz de unirse a estas proteínas de manera independiente y dependiente al ABA, y que regula su actividad negativamente (202). Las SnRK2 también se regulan mediante reacciones de S-nitrosilación en presencia de óxido nítrico (203) y mediante unión de PA en situaciones de estrés salino (204).

El ejemplo mejor descrito en las rutas de señalización mediadas por SnRK2 es la regulación del cierre estomático. SnRK2.6 (*OST1, Open Stomata 1*) se activa en presencia de ABA o estrés osmótico, provocando la producción de ROS mediante la activación de RBOHD y RBOHF. Esta producción de ROS produce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , que modula la actividad de distintos transportadores iónicos, como el canal aniónico SLAC1 o el canal de potasio KAT1 (95, 131). Estas dos proteínas se encuentran reguladas a su vez mediante la fosforilación por parte de SnRK2.6 y SnRK2.3, que son necesarias para la activación de SLAC1 (205, 206) y para la inhibición de KAT1 (207). Adicionalmente se ha visto que SnRK2.6 es capaz de cerrar los estomas en condiciones de exceso de  $\text{CO}_2$  (208),  $\text{O}_3$  (209) y patógenos (210).

También se ha descrito que la activación de SnRK2.6 resulta en la fosforilación y activación de distintos factores transcripcionales implicados en la expresión de proteínas de tolerancia al estrés, como RD29B o RD22 (211). SnRK2.2, SnRK2.3 y SnRK2.6 regulan positivamente los ABFs (*ABRE-binding factors*), elementos reguladores reconocidos por los factores de transcripción de respuesta al ABA (212).

Poco se conoce acerca de la función de las SnRK2 del grupo II, aunque se ha visto que los mutantes de estas proteínas presentan una fuerte sensibilidad al estrés osmótico, además de otros fenotipos como la reducción del número de raíces laterales o la represión de factores de transcripción relacionados con el estrés hídrico (213). Otros estudios han demostrado que varias proteínas de este grupo (SnRK2.7 y

SnRK2.8) están implicadas en la regulación del metabolismo nutricional de *Arabidopsis*, modulando el crecimiento de la planta en condiciones de estrés nutricional y la actividad de distintas enzimas implicadas en la fijación del carbono (214). La producción de un mutante décuplo de todas las SnRK2 de *Arabidopsis* (215) mostró que la planta presentaba sensibilidad al estrés osmótico debido a un defecto en la producción de prolina e IP, además de ser incapaz de acumular y responder al ABA. Sin embargo, no padecía ninguna alteración metabólica en condiciones normales. La comparación de los mutantes sensibles a ABA y los insensibles a ABA mostró que las SnRKs son un punto de *cross-talk* entre las señales de estrés osmótico dependientes e independientes de ABA (213, 215).

Adicionalmente, se ha descrito un papel de las SnRK2 en el control de la arquitectura de la raíz en condiciones de estrés salino. Los mutantes *snrk2.4* y *snrk2.10* presentan alteraciones en el desarrollo de la raíz bajo un régimen de salinidad. SnRK2.4 particularmente parece estar implicado en la elongación de la raíz principal, mientras que SnRK2.10 regula la producción de raíces laterales (136).

### SnRK3

Las SnRK3 son una subfamilia de SNF1/AMPK/SnRK exclusiva del reino vegetal. Como característica única, las SnRK3s poseen un dominio C-terminal, variable dentro de la familia, donde puede encontrarse un dominio de autoinhibición llamado FISL (o motivo NAF) y un dominio de interacción con fosfatasa (dominio PPI) (216).

El motivo NAF se encuentra adyacente al dominio quinasa catalítico y se compone de la secuencia consenso:

X	L	N	A	F	D	I	I	S	L	S	X	G	F	D	L	S	G	L	F	E
M					E	L		A	M			F	L	N		A	N	F		D
I					Q	F		T	F			D	S	S		E	S			G
F						M		G	Y			E		G		G	T			A
Y								L	S			S					P			
								I	T											
									G											

La identidad y posición de los aminoácidos NAF-I-S-L-F están conservados en todos los individuos de la familia (217). Este dominio conforma el sitio de interacción con las proteínas de la familia CBL (*Calcineurin B-Like proteins*), que son reguladoras de la actividad y localización de las SnRK3. El estudio de la función y regulación de las SnRK3 se ha desarrollado históricamente de manera conjunta al de las CBLs, por lo que son denominadas también CIPKs, de *Calcineurin B-like Interacting Protein Kinases*. En adelante se usará esta notación por ser la más usada en la literatura.

El mecanismo general de activación por parte de las CBLs, cuya actividad y capacidad de adhesión a sus *partners* de interacción viene determinado por el número de cationes  $\text{Ca}^{2+}$  que haya incorporado a sus EF-hands (218), es la unión al sitio FISL de la CIPK, lo que produciría un cambio conformacional necesario para la activación de la quinasa. Adicionalmente, las CBLs están implicadas en el reclutamiento de la CIPK al sitio de acción mediante modificaciones del N-terminal de la CBL (218, 219).

Al igual que en las SnRK2, las CIPKs contienen en su C-terminal un dominio de unión a fosfatasa, lo que sugiere una regulación negativa de su actividad. Se ha observado que las PP2C forman complejos estables CIPK-PP2C (218). Aunque el mecanismo de acción de las PP2C no se conoce en detalle, la cristalización de complejos CBL-CIPK indica que la interacción con CBLs o PP2Cs con las CIPKs son mutuamente excluyentes por interferencias estéricas, de manera que la activación de la quinasa por la CBL es incompatible con la unión de la fosfatasa (218). Por tanto, la unión de la CBL y la activación de la CIPK están acopladas y resultan en la disociación de la fosfatasa.

La comparación de la secuencia y estructura génica de las diferentes CIPKs permiten su clasificación en dos grandes grupos filogenéticos. El primero se caracteriza

por la abundancia de intrones en la secuencia genómica de sus miembros y engloba a CIPK1, CIPK3, CIPK8, CIPK9, CIPK17, CIPK23 y CIPK24. El segundo grupo estaría conformado por las CIPKs que no presentan intrones en su secuencia. Este grupo es más grande y heterogéneo, englobando a las CIPKs restantes (112).

La resolución de la estructura atómica de complejos CIPK/CBL ha permitido dilucidar la naturaleza de la especificidad de las interacciones entre las quinasas y sus activadores. En Sanchez-Barrena et al., 2013 (218) se muestra como el dominio NAF/FISL, donde puede apreciarse una mayor divergencia en su secuencia entre las diferentes CIPKs, conforma dos alfa hélices que determinan la especificidad de unión entre las quinasas y las CBL. Este dominio forma la hendidura (*binding cleft*) donde se aloja la CBL.

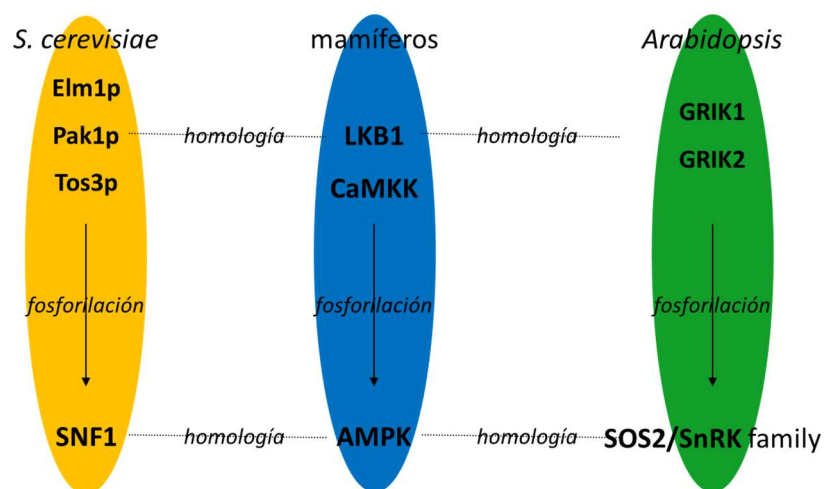
Las CIPKs están implicadas en multitud de procesos celulares diferentes, todos mediados por su interacción con su CBL acompañante. Los procesos regulados por CIPKs mejor descritos son la fosforilación del antiportador de membrana SOS1 por CIPK24/CBL4 (68, 220), la fosforilación de los transportadores de potasio AKT1 y HAK5 por CIPK23/CBL1 (221, 222), y de los transportadores de nitrato CHL1 y de amonio AMT1 por CIPK23 (223, 224). El transportador de  $\text{NO}_3^-$  NPF6.3 también es activado por CIPK23/CBL9, mediando el transporte del anión al simplasto de la raíz y hacia el xilema (225). Los canales de cloro SLAC1 y SLAH3 son activados por CIPK23/CBL1, CBL9 en el proceso de cierre estomático de los estomas mediado por ABA (205, 206). La fosforilación de la  $\text{H}^+$ -ATPasa de membrana plasmática por parte de CIPK11/CBL2 regula negativamente la inhibición de la bomba por adhesión de proteínas 14-3-3 (226). Por último, CIPK26/CBL9, CBL1 fosforila el C-terminal de RBOHF, induciendo la producción de ROS en *Arabidopsis* (109), mientras que CIPK6/CBL10 fosforilan a RBOHB en tabaco (227).

#### Regulación N-terminal de las proteínas SnRK

Un rasgo regulatorio común a todas las proteínas SNF1/AMPK/SnRK es la presencia en entre los subdominios quinasa VII-VIII de una región reguladora de la

actividad conocida como lazo de activación o *T-loop* (228, 229). Este dominio, contiene entre uno y tres residuos fosforilables (serina/treonina/tirosina) fundamentales para la activación de la quinasa (230, 231). Este mecanismo de regulación de la actividad es común a multitud de proteínas quinasas. La fosforilación provoca un cambio conformacional, fundamental para la reacción de catálisis, en la posición relativa de los residuos que conforman el sitio de reconocimiento del ATP y del péptido sustrato (232–236).

Aunque las secuencias flanqueantes de estos residuos varían ampliamente entre las diferentes subfamilias de quinasas, la posición relativa de los sitios de fosforilación se encuentra muy conservada (230). El estudio en detalle de las diferencias en composición ha revelado que la naturaleza de los residuos flanqueantes a estos sitios de fosforilación críticos es relevante en la actividad de la quinasa, ya que distintas composiciones del *T-loop* producen proteínas con diferentes niveles de actividad al ser fosforiladas. La comparación del mutante hiperactivo de CIPK24, CIPK24 $\Delta$ 308-T168D, con la forma mutante de CIPK23, CIPK23 $\Delta$ 331-T190D mostró grandes diferencias en la actividad quinasa *in vitro* entre las dos quinasas. La comparación de la estructura de sus *T-loop* señaló a una alfa hélice estabilizadora adyacente al dominio de activación de CIPK23, que no se encontraba en CIPK24, provocaba una reducción de la actividad basal de la quinasa (193).



**Fig. 3 Esquema de homología y actividad de las quinasas SNF-like y sus quinasas activadoras.**



Las quinasas activadoras de las SNF1/AMPK/SnRK han sido descritas previamente en animales y levaduras. Los activadores de AMPK en animales son LKB1 y CAMKKs (237, 238), y los de Snf1 en *S. cerevisiae* son Elm1, Sak1 y Tos3 (239, 240). En *Arabidopsis*, SnRK1 se activa mediante la fosforilación de GRIK1 y GRIK2 (230).

LKB1 (*Liver Kinase B1*) actúa sobre AMPK en situaciones de requerimientos de azúcar por movimiento muscular y en señalización de apoptosis por estrés de carbohidratos. También tiene actividad durante el desarrollo del embrión en mamíferos y en regulación de procesos de polaridad en la arquitectura celular (241, 242).

A la subfamilia CaMKK (*Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase*) pertenecen varias quinasas. Estas quinasas responden a la variación de los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelulares en distintos tipos celulares, siendo su activación independiente del cAMP. También inducen la activación de AMPK en la ruta de síntesis del óxido nítrico. La más eficiente en la activación de AMPK es CaMKK $\beta$ . Otras quinasas activadas por CaMKK son CaMKI o CaMKIV (241, 243).

En *S. cerevisiae*, la fosforilación por Sak1 (*Snf1 Activating Kinase1*), la proteína con más homología con las proteínas GRIK1 y GRIK2 de *Arabidopsis*, provoca la migración de Snf1 al núcleo en condiciones de estrés en el metabolismo de carbohidratos (94). Tos3 (*Target of SBF protein 3*) es la encargada de fosforilar a Snf1 en condiciones de crecimiento en fuentes de carbono no fermentables (95). Elm1 (*ELongated Morphology 1*) es un regulador del desarrollo de la levadura y su mutación induce una elongación anómala en la levadura, resultado de la imposibilidad de separar las células madre e hija (96).

Mediante la complementación funcional del mutante *elm1 sak1 tos3* de *S. cerevisiae* (244), se encontraron los activadores vegetales de proteínas quinasas de tipo SnRK1, denominados **SnAK2** y **SnAK1** (*SnRK1-Activating Kinase*) o **GRIK1** y **GRIK2** (*Geminivirus Rep-Interacting Kinase*). GRIK1 y GRIK2 fueron descritas por primera vez al detectar un aumento de su expresión como resultado de la infección por geminivirus y por su capacidad de unirse a la proteína de replicación vírica AL1 (244, 245). Experimentos posteriores mostraron que tanto GRIK1 como GRIK2 funcionan como

quinasas activadoras de SnRK1 en *A. thaliana*. GRIK1 y GRIK2 eran capaces de fosforilar al péptido que conforma el *T-loop* de la familia SnRK1 *in vitro* (194, 230, 246).

Se ha descrito que los genes *GRIK1* y *GRIK2* se expresan preferencialmente en el meristemo apical del tallo, en los primordios de las hojas y el peciolo (244) pero resultados no publicados del Dr. Hiroaki Fujii, así como estudios transcripcionales masivos (185) indican que su expresión se da también a lo largo de la raíz, preferencialmente en la zona de elongación, y en los tejidos vasculares de la parte aérea.

La regulación N-terminal de las SNF-like presenta similitudes robustas en las distintas subfamilias que conforman el grupo. Este hecho, junto a los estudios bioquímicos previos de la actividad de SOS2/CIPK24 que muestran que su actividad varía fuertemente con la modificación del estado de fosforilación de su *T-loop*, nos ha llevado a investigar si las proteínas GRIK juegan un papel regulador en la actividad de las CIPKs y si esta regulación tiene algún efecto en la tolerancia de *Arabidopsis* al estrés salino.

#### *LRR-RKs*

Las proteínas LRR-RK (*Leucine Rich Repeat-Receptor Kinase*) forman la familia más numerosa de receptores quinasa de plantas, incluyendo más de 200 proteínas en *Arabidopsis* (247, 248).

Las LRR-RK regulan una amplia variedad de procesos relacionados con el desarrollo y la respuesta a estrés biótico, incluyendo la identidad de células madre, la percepción de hormonas, la respuesta a lesiones o la simbiosis (249). Las LRR-RK conforman homodímeros y heterodímeros en su forma activa, generando un nivel adicional de complejidad en la respuesta a estímulos mediante la multiplicación de interacciones (249). Aunque estructuralmente todas las LRR-RK son similares, existe una gran variabilidad entre los ligandos que pueden activarlas: brasinoesteroides, péptidos (fitosulfoquina, sistemina) y proteínas de secreción (CLV3) (156, 249–253).

El dominio LRR es una secuencia de 24 aminoácidos con un espaciamiento conservado de leucinas. Está presente en proteínas de todos los reinos de la vida y generalmente está implicado en interacciones proteínas-proteína (254). La cristalización del inhibidor de la ribonucleasa porcina, una proteína citoplasmática formada exclusivamente por LRRs, reveló que la secuencia forma una estructura  $\beta$ -lamina/ $\beta$ -giro que alinea en tándem, generando una estructura de interacción entre proteínas (255). Las LRR de plantas presentan una secuencia consenso del tipo "L X X L X X L X X L X X N X L G X I P X X", donde las X representan residuos no conservados y las leucinas subrayadas indican el sitio de  $\beta$ -lamina/ $\beta$ -giro. Los residuos no conservados determinan la especificidad de cada interacción entre proteínas, determinando el ligando de cada LRR-RK (251).

La mayoría de las proteínas vegetales con sitios LRR extracelulares son de la familia LRR-RK, que presentan casi en su totalidad la siguiente estructura: un péptido señal N-terminal, un dominio LRR extracelular, un dominio transmembrana único, y un dominio quinasa citoplasmático. Algunas LRR-RK presentan también un par de cisteínas que facilitan la dimerización del receptor (249). En *Arabidopsis*, la variabilidad en el número de repeticiones del motivo LRR varía entre 1 y 32. Algunas LRR-RK presentan estas repeticiones en tándem, mientras que otras poseen secuencias de aminoácidos espaciadoras conocidas como *loop-out* (247).

Aunque el mecanismo de acción de las LRR-RK no se conoce en detalle, existen evidencias de que su funcionamiento es similar al de los RTKs (*Receptor Tyrosine Kinase*) de mamíferos, esto es, mediante la formación de homo- o heterodímeros que contienen un dominio receptor y un dominio quinasa. La unión del ligando al receptor induce la transfosforilación del componente quinasa, lo que dispara la actividad del mismo (249, 256, 257).

Existen algunos ejemplos bien caracterizados de diferentes rutas de señalización iniciadas por LRR-RLK en plantas. En la regulación por brasinoesteroides el receptor BRI1 une a su ligando BL, directamente o mediante la unión a una proteína de unión de brasinoesteroides. Esta unión induce la transfosforilación del complejo BRI1–BAK1, que induce el proceso de señalización que desemboca en la inhibición de la glicógeno

sintasa quinasa 3 (GSK-3), lo que suprime la degradación mediada por fosforilación de sus targets BES1 y BZR1. Estas dos proteínas migran al núcleo, donde promueven la expresión de los genes dependientes de señalización de brasinoesteroides (258, 259).

La señalización por la ruta CLAVATA conforma un ciclo de retroalimentación positiva. CLV y WUS controlan el destino celular y el número de divisiones de las células del meristemo apical. CLV3 se produce en las células superficiales del meristemo apical del tallo, asociándose al complejo heterodimérico CLV1–CLV2, que se encuentra activo en las capas inferiores del meristemo. El complejo de tres proteínas recluta a Rho, una GTPasa. Esta ruta finaliza en la inhibición de POL, una proteína fosfatasa 2C con una secuencia de migración al núcleo. Esta inhibición produce la represión del factor de transcripción WUS, inductor de la expresión de *CLV3* (249).

Otro mecanismo mediado por LRR-RLK es la respuesta celular a la interacción de FLS2 con el PAMP flagelina, que como hemos mencionado previamente, activa la ruta MEKK1-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6, que induce la expresión de *WRKY29* y *FRK1* (147).

## GSO1

GSO1 es una LRR-RK que fue descrita por primera vez en *Arabidopsis* como un factor esencial en el desarrollo de la superficie epidérmica del embrión. Los mutantes *gso1 gso2* presentaban un fenotipo pleiotrópico en la germínula y los tejidos aéreos de la planta: alto grado de permeabilidad, distribución y densidad estomática anormal, inhibición en la elongación celular y fusiones anómalas de partes de la planta en el desarrollo embrionario (260). El estudio de los embriones del mutante doble mostró que todos estos efectos venían producidos por una formación defectuosa de la epidermis y la cutícula durante el desarrollo embrionario.

El estudio de mutantes en el desarrollo del embrión permitió dilucidar que GSO1 y GSO2 actuaban aguas arriba en la regulación del factor de transcripción de identidad de la epidermis ALE1 (Homeobox-leucine zipper protein MERISTEM L1).

El estudio en detalle del fenotipo de mutante *gso1 gso2* (261) mostró además problemas en el desarrollo de la raíz, que presentaba una distribución anormal en los tejidos meristemáticos y en la elongación de la raíz, además de planos de división anómalos en las células madre del meristemo radicular. El estudio de la expresión de genes en estos tipos celulares mostró una transcripción alterada de los genes de identidad celular, tanto en células madre como en los tipos celulares diferenciados.

Este estudio también mostró que los problemas en la arquitectura de la raíz podían ser subsanados mediante la adición de azúcares metabolizables durante la germinación y el desarrollo, pero que este suplemento metabólico no modificaba los marcadores de tipo celular, la expresión anómala de genes o la permeabilidad de la cutícula. El estudio más detallado de la expresión de *GSO1* y *GSO2* mostró que ambos genes se expresan preferencialmente en la raíz, existiendo tejidos de expresión conjunta y sitios de expresión única de ambas proteínas, variando estos patrones durante el desarrollo de la planta. *GSO1* se encuentra preferencialmente en la endodermis y la vasculatura, además de los tejidos meristemáticos más jóvenes. *GSO2* se expresa en los tejidos de la parte aérea durante 3 días tras la germinación, en la epidermis de la raíz madura, en el primordio de las raíces laterales y el centro quiescente.

El único estudio del mutante simple *gso1* (también denominado *schengen 3*, *sgn3*) es el de Pfister et al., 2014 (262). En este estudio se observa que *GSO1* es fundamental en la señalización de la formación de la banda de Caspari. Particularmente, *GSO1* está implicada en la señalización del acoplamiento de los polímeros de proteína CASP (*CAsparian Strip domain Proteins*) que permiten la generación de la banda de Caspari, diferenciando los polos celulares del anillo que separa el córtex de la endodermis. Este anillo es fundamental para múltiples procesos relacionados con la formación de la banda de Caspari, como son la fijación de las células del anillo a las paredes celulares que las rodean, la suberización del exterior celular o el mantenimiento de la polaridad en estas células que impide el flujo de componentes de la membrana a través de la barrera formada.

El efecto de la mutación *gso1* sobre las proteínas CASP y la formación de la banda de Caspari no suprime completamente la formación de la estructura, sino que provoca discontinuidades y una conformación inmadura del anillo CASP, lo que indica que el papel de GSO1 en este proceso es regulador y no iniciador.

El estudio posterior de Nakayama et al., 2017 (263) determinó dos ligandos activadores de GSO1. Los péptidos CIF1 y CIF2 son fundamentales para la activación y desarrollo de la función de GSO1, presentando el mutante doble *cif1 cif2* un fenotipo en el desarrollo de la banda de Caspari idéntico al del mutante *gso1*. El estudio en la expresión de los genes que codifican los péptidos activadores de GSO1 indican que la presencia de estos se circunscribe a la estela de la raíz, fundamentalmente en la zona madura de la misma.

Es interesante destacar que los mutantes *cif1 cif2* presentan un fenotipo en el desarrollo de la raíz similar al de los mutantes dobles *gso1 gso2* en presencia de azúcar, esto es, una germinación correcta y un desarrollo de la raíz normal, pero una formación de la cutícula de la endodermis defectuosa. Esto sugiere la diversión de la ruta señalizadora en la actividad de las LRR-RK GSO1 y GSO2 en dos procesos dependientes e independientes del metabolismo del azúcar.

El estudio de la respuesta del mutante *gso1* a cambios ambientales mostró que este es muy sensible a variaciones de la temperatura y el ciclo de luz, presentando el mutante un crecimiento reducido a 24 °C o en día largo. Adicionalmente, el estudio del balance nutricional del mutante indicó que, en condiciones de crecimiento normal, el mutante acumulaba K<sup>+</sup> en menores cantidades que el silvestre. Esta deficiencia nutricional era previsible considerando la falta de una barrera en el apoplasto que favorezca la acumulación de nutrientes en contra de gradiente en los interiores de la raíz. Los autores hipotetizan que el K<sup>+</sup> es el único nutriente que sufre una deficiencia nutricional debido a que es el único que se adquiere y transporta en su forma iónica (por contraposición al P o el N, cuya nutrición va asociada a su incorporación a macromoléculas orgánicas) y a que el K<sup>+</sup> es el nutriente que se acumula en mayor cantidad, siendo por tanto el más sensible a una pérdida inespecífica por difusión osmótica (262).

El estudio de los cationes divalentes  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  mostró diferencias en la nutrición de ambos. Mientras que el  $\text{Ca}^{2+}$  se encontraba en el mutante *gso1* acumulado en la misma concentración que en el silvestre, el  $\text{Mg}^{2+}$  presentaba una mayor acumulación en todos los tejidos. Los autores achacan la diferencia en este comportamiento a la posible movilidad superior del  $\text{Mg}^{2+}$  por el espacio apoplástico.

Es interesante destacar en el contexto de esta memoria de investigación, que el  $\text{Ca}^{2+}$  presenta una fuerte tendencia a mantenerse fuera del espacio simplástico en todas las células vegetales, existiendo dos teorías fundamentales acerca de su entrada en la planta, vía espacios inmaduros de raíces laterales y extremo apical de la raíz (264), o mediante un flujo simplástico mínimo, que se daría significativamente en la endodermis (265). Es por ello muy significativo que huecos en la barrera apoplástica no produzcan una pérdida por gradiente de los iones  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que sugiere la posibilidad de un mecanismo activo de transporte simplástico de  $\text{Ca}^{2+}$ .

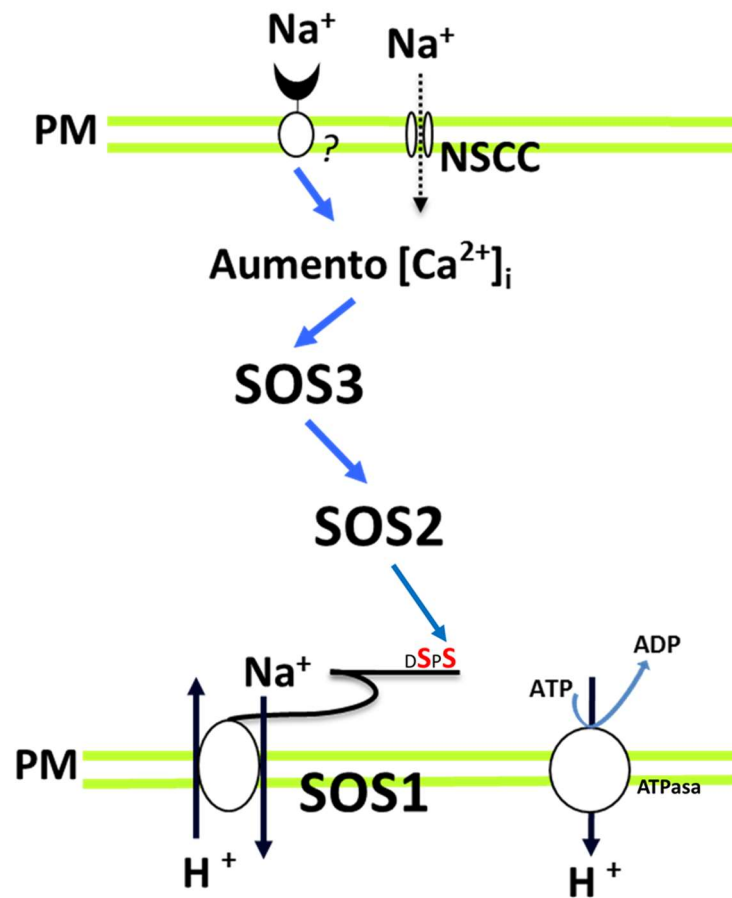
El fenotipo de absorción y distribución anómala de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  por parte del mutante *gso1*, nos llevó a preguntarnos si, además de su papel regulador sobre la arquitectura de la raíz, podría existir un papel regulador sobre las proteínas encargadas del transporte de larga distancia del  $\text{Na}^+$  en el interior de la planta. Esto nos llevó a buscar interacciones entre esta LRK y los miembros de la familia SOS, además de sobre HKT1.

### *Ruta SOS*

La ruta SOS es el mecanismo bioquímico más estudiado dentro de respuesta vegetal al estrés provocado por  $\text{Na}^+$ . Descrita por primera vez en *A. thaliana* (266), estudios posteriores y la secuenciación de diversas especies indican que los principales componentes de esta ruta (SOS1, SOS2 y SOS3) se encuentran conservados en todas las especies de plantas superiores (267–270).

Identificados inicialmente en un rastreo de mutantes de *Arabidopsis* con un fenotipo de fuerte sensibilidad a la presencia  $\text{Na}^+$  (271), el estudio pormenorizado de

los mutantes *sos1*, *sos2* y *sos3* ha permitido determinar la naturaleza y función de estas proteínas y de sus interacciones.



**Fig. 4 Modelo de Funcionamiento del sistema SOS**

## SOS1

**SOS1** (*Salt-Overly-Sensitive 1*), es un antiportador sodio/protón electroneutro de membrana plasmática (65) perteneciente a la subfamilia NhaP, incluida en la familia CPA1 de antiportadores de cationes presentes en todos los grupos taxonómicos eucariotas (272). SOS1 presenta una alta especificidad por el Na<sup>+</sup>, algo menor por Li<sup>+</sup> e incapaz de transportar otros cationes monovalentes como el K<sup>+</sup> (67, 273).

La fusión del promotor de *SOS1* al gen *GUS* ha permitido localizar la expresión de *SOS1* preferentemente en tejidos circundantes a la vasculatura. Dentro de la raíz, el



transportador se expresa principalmente en el periciclo y en las células parenquimáticas que rodean los vasos del xilema, además de las células epidérmicas del ápice de la raíz. En la parte aérea, la expresión de *SOS1* parece reducirse a las células parenquimáticas del límite xilema/simplasto (65).

*SOS1* está conformado por una región hidrofóbica N-terminal con 12 alfa-hélices, que dan lugar al poro donde se realiza el intercambio sodio/protón (274), y un dominio C-terminal citoplasmático con 700 aminoácidos, cuya secuencia presenta variabilidad entre las distintas especies (220). Esta región contiene a su vez distintos dominios relevantes para la actividad y regulación del antiportador: un dominio de unión a calmodulina y otro dominio de unión a *SOS3* (F.J Quintero; resultados no publicados), un dominio de posible unión a nucleótidos cíclicos y un dominio autoinhibidor (67, 275).

El estudio de la actividad del antiportador en mutantes de delección del extremo C-terminal (220) permitió demostrar que el dominio comprendido entre los aminoácidos N-1013 y L-1047, cercano al final de la proteína (1146 aminoácidos), reprime la actividad del antiportador en la conformación nativa de la proteína. La eliminación de este dominio autoinhibidor resulta en una proteína constitutivamente activa. El fragmento C-terminal 998-1146 interacciona *in vivo* con una proteína *SOS1* truncada desde el residuo 998 (*SOS1*Δ998), lo que sugiera una autoinhibición *in cis* de *SOS1* por parte del extremo C-terminal de su cola citoplasmática. En cambio, usando una truncación *SOS1*Δ742 no se observó interacción entre ambos dominios del antiportador, permitiendo delimitar la interacción del fragmento autoinhibidor 1012-1047 con el área comprendida entre los aminoácidos 742 y el 998.

Experimentos de fosforilación *in vitro* de distintos fragmentos peptídicos del C-terminal de *SOS1* permitieron determinar que la quinasa *SOS2* fosforilaba exclusivamente el mencionado dominio de autoinhibición 998-1146. Adicionalmente se observó que *SOS2* interactuaba únicamente con el dominio 998-1146 en experimentos de doble híbrido en levadura. La determinación de fosfoaminoácidos del fragmento 998-1146 tratado con *SOS2* mostró que la reacción de fosforilación se producía en el residuo de serina-1138, sito dentro del dominio IVVRIDSPSKIV. No

obstante, los estudios de fosforilación *in vitro* e *in vivo* de los mutantes de sustitución SOS1-S1136A y SOS1-S1138A mostraron que ambas serinas eran fundamentales para la fosforilación de SOS1 por SOS2. Este dominio de fosforilación de SOS2 en SOS1 se encuentra en todas las formas de SOS1 presentes entre las plantas superiores.

## SOS2

SOS2 (*Salt-Overly-Sensitive 2*), también llamada CIPK24 (*CBL-interacting-protein-kinase 24*) y SnRK3.11 (*SNF1-related protein kinase 3.11*), es una quinasa de la subfamilia SnRK3/CIPK.

SOS2 es una proteína quinasa de tipo serina/treonina, y su actividad es fundamental en la respuesta tolerante de *Arabidopsis* al estrés salino (271, 276). Dentro de la ruta SOS, SOS2 es activada por la interacción con las proteínas de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , SOS3/CBL4 y SCABP8/CBL10. Estas CBLs también son del reclutamiento de SOS2 hasta la membrana plasmática donde fosforila a SOS1 e induce el antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (273, 277).

La interacción de SOS2 con las CBLs se produce en el motivo FISL (o dominio NAF). La delección del motivo FISL provoca un aumento de la actividad quinasa de SOS2 *in vitro*, lo que indica una función autoinhibidora de este dominio (278).

SOS2 está conformado por una estructura canónica de serina/treonina quinasa, similar a la de SNF1 (193, 279), con un dominio quinasa dividido en dos lóbulos conectados por el dominio de activación (*T-loop*). En su conformación nativa, el dominio quinasa de SOS2 se encuentra en una conformación abierta, que deforma parcialmente el sitio catalítico de la enzima. Son la fosforilación del *T-loop* y la unión de una CBL al sitio NAF los eventos que estabilizan la estructura del dominio quinasa de la proteína, permitiendo la actividad enzimática (193). SOS2 y CIPK8 forman una subfamilia dentro de las CIPKs con la actividad basal más elevada dentro de la familia debido a la ausencia del dominio estabilizador  $\alpha\text{T2}$ , que permite la estabilización de una estructura inactiva en el resto de CIPKs. Esta cualidad estructural, que produce un

mayor rango de estados de actividad quinasa, podría ser la responsable de la aparición de mecanismos regulatorios *trans* adicionales como son inhibición por unión a GIGANTEA o a proteínas 14-3-3 (193, 280, 281). Existen tres residuos fosforilables conservados dentro del *T-loop* de activación de las quinasas SnRK3 (193, 282). La modificación de las serinas-156, treonina-168 y tirosina-175 a aspartato incrementó la actividad de SOS2 *in vitro* (216). Adicionalmente, plantas transgénicas que expresaban la versión mutante de SOS2-T168D, que mimetiza el estado fosforilado del *T-loop*, presentaban una mayor tolerancia a la sal (231).

### SOS3

SOS3, también llamada CBL4 (*Calcineurin B-Like protein 4*) funciona como un sensor del  $\text{Ca}^{2+}$  liberado a causa de la alteración en la homeostasis del  $\text{Na}^+$  citoplasmático.

SOS3 pertenece al grupo de las CBL (*Calcineurin B-Like proteins*), una familia de 10 proteínas única del reino vegetal, similares en su secuencia y estructura a la subunidad B de la fosfatasa calcineurina y a los sensores de calcio neuronales NCS (111, 216). Las CBL ejercen su función mediante la unión con otras proteínas, fundamentalmente CIPKs, regulando positivamente su actividad y determinando su localización subcelular. Este proceso se da como respuesta a variaciones bioquímicas u hormonales que, provocadas por situaciones de estrés o eventos del desarrollo de la planta, desembocan en variaciones controladas de los niveles de calcio citoplasmático.

SOS3 está conformado por dos dominios, cada uno de ellos contiene por una alfa-hélice exterior y dos sitios *EF-hand* centrales, unidos por un pequeño espaciador. Experimentos *in vitro* han mostrado que SOS3 tiende a dimerizar en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  libre y que esa dimerización, así como la unión de  $\text{Ca}^{2+}$ , estabilizan la estructura de la proteína haciendo accesibles los sitios de unión a CIPK que permiten la interacción con SOS2 y SOS1 (283).

La resolución estructural de un complejo entre el C-terminal de SOS2 y SOS3 muestra que hay únicamente 2 cationes  $\text{Ca}^{2+}$  de los 4 posibles unidos a los dominios *EF-hand* de la CBL, indicando que es necesaria una señal específica de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático para que se produzca la unión (218). La estabilidad del complejo SOS2/SOS3 requiere también de la fosforilación de la CBL por parte de la CIPK, mecanismo que se encuentra probablemente conservado en la formación de todos los complejos CBL/CIPK (217, 284).

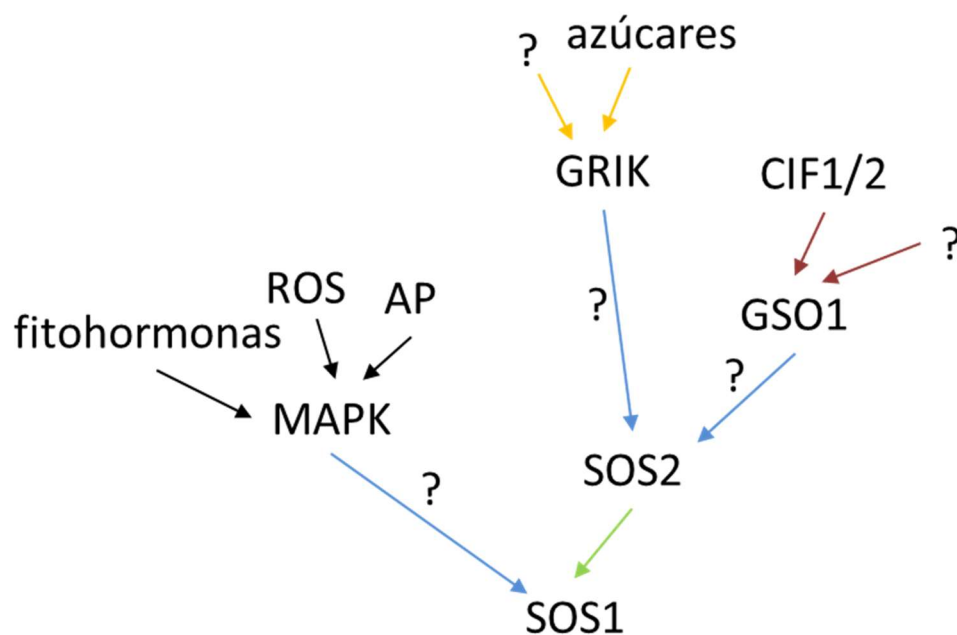
SOS3 posee señales de miristoilación y de palmitoilación en su N-terminal que permiten su agregación a la membrana plasmática (218). Este mecanismo de modificación post-traducciona l de la cola N-terminal de SOS3 se encuentra presente, con excepciones, en otras CBLs. Estas acilaciones de las CBLs suponen un mecanismo de regulación de la localización subcelular de los complejos CBL/CIPK (218, 285).

Adicionalmente a la regulación de SOS2, SOS3/CBL4 desempeña funciones reguladoras en otros procesos fisiológicos como la formación y elongación de los primordios de raíces laterales mediada por ABA y auxinas (286), la regulación de la acumulación de antocianinas en situaciones de estrés salino (287), y la regulación dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de los filamentos de actina en presencia de estrés salino (288).

### Modelo general.

La descripción del mecanismo de regulación de SOS1 por parte de SOS2-SOS3 fue el punto de partida para la modelización del comportamiento molecular de las células vegetales en respuesta a niveles tóxicos de sodio. Los estudios posteriores y el aumento de la información acerca de este mecanismo nos ha permitido determinar que la regulación de SOS1 por SOS2 no es un proceso sencillo, sino que está sometido a múltiples elementos de regulación adicionales que son los encargados de modular la respuesta última de la planta a las señales de estrés salino. En este trabajo nos hemos centrado en el papel regulador de las MAPK, las proteínas GRIK y las LRK, y su efecto sobre SOS1 y SOS2, y sobre la capacidad de la planta de tolerar la presencia de sodio. La regulación por fosforilación es un mecanismo biológico conservado en la práctica

totalidad de procesos metabólicos de los eucariotas. La modificación en la actividad de una proteína mediada por el cambio conformacional que produce la adhesión de un grupo fosfato es un mecanismo que permite controlar de manera rápida y precisa la respuesta de los organismos vivos a diferentes estímulos. En este trabajo nos centramos en este tipo de regulación, buscando desentrañar las rutas por las que SOS1 es regulado a través de la fosforilación de su C-terminal, directamente o a través de la regulación de SOS2 por otras quinasas de rango superior.



**Fig. 5** Resumen esquemático de las interacciones estudiadas en este trabajo.



## Objetivos

Los objetivos de esta memoria de investigación han sido:

1. Estudio de la regulación del SOS1 por MAPK y su interacción con SOS2.
2. Determinar el papel de las proteínas GRIK1 y 2 en la regulación de la ruta SOS a través de SOS2.
3. Analizar la posible función de GSO1 en la absorción y movilización de sodio en la planta a través de la regulación de la actividad de SOS1 y HKT1.

Para acometer estos objetivos, se han llevado a cabo una serie de ensayos de biología molecular, fisiología vegetal y análisis funcional de proteínas. Para ello se ha utilizado los organismos modelo *A. thaliana* y la levadura *S. cerevisiae*.





## Materiales y métodos.

### Material biológico.

Bacterias.

*Líneas usadas.*

#### ***Escherichia coli.***

Todas las propagaciones de ADN plasmídico y clonajes se realizaron con las cepas de *E. coli*:

Cepa	Genotipo	Referencia
<b>XL1 blue</b>	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 re1A1</i> <i>lac {F' proAB lacI<sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (tetR)}</i>	Bullock <i>et al.</i> , 1987 (289)
<b>XL10 gold</b>	$\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173$ <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 re1A1 Hte</i> <i>lac {F' proAB lacI<sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (tetR) Amy CamR}</i>	Stratagene
<b>One Shot TOP10</b>	<i>F- mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lacX74</i> <i>recA1 ara139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR)</i> <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
<b>BL21(DE3)</b>	<i>hsdS gal (λIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1</i>	Studier <i>et al.</i> , 1986 (290)

**XL1-blue, XL10-gold y TOP10** se utilizaban indistintamente según disponibilidad para procedimientos de propagación de ADN plasmídico o específicamente según requerimientos concretos en procesos de clonado o propagación.

**BL21** se utilizaba para la expresión de proteína recombinante en *E. coli*, ya que presenta un potente sistema de inducción de la expresión activado por IPTG (ARN polimerasa T7 bajo el promotor LacUV5). Además, carece de las proteasas OmpT y Lon, por lo que resulta especialmente conveniente para este procedimiento.

### ***Agrobacterium tumefaciens.***

*A. tumefaciens* se utilizó para la expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana* y para la transformación estable de *A. thaliana*.

Cepa	Genotipo	Referencia
<b>GV3101</b>	<i>Rif<sup>R</sup> pMP90 (pTiC58DT-DNA)</i>	Koncz y Schell, 1986 (291)
<b>p19</b>	pBin61-p35S:p19	Voinnet <i>et al.</i> , 2003 (292)

### *Medios y condiciones de cultivos bacterianos.*

#### ***E. coli.***

Para los cultivos de *E. coli* se utilizó medio Lysis-Broth (**LB**) modificado, sustituyendo la sal sódica original por KCl. En caso de ser necesario, el medio era suplementado con el antibiótico selectivo correspondiente, ampicilina (100 mg/L), kanamicina (50 mg/L) o estreptomycin (25 mg/L). Todos los cultivos se realizaron a una temperatura de 37 °C.

#### Medio LB.

Bacto™ yeast extract (Difco)	0.5% (p/v)
Bacto™ tryptone (Difco)	1% (p/v)
KCl	1% (p/v)

Para la preparación de medio LB sólido se añadía 1.5% (p/v) de Bacto™ Agar (Difco).

Para la preparación de células competentes de *E. coli* se utilizó medio *Super Optimal Broth (SOB)* y *Super Optimal broth with Catabolite repression médium (SOC)*.

Medio SOB.

Bacto™ tryptone (Difco)	2% (p/v)
Bacto™ yeast extract (Difco)	0.5% (p/v)
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM

Medio SOC

Bacto™ tryptone (Difco)	2% (p/v)
Bacto™ yeast extract (Difco)	0.5% (p/v)
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Glucosa	20 mM

Para el mantenimiento a largo plazo de plásmidos, se conservaron los transformantes a -70 °C, tras añadirle un 15% de glicerol esterilizado a 1 mL de suspensión de células en medio de cultivo.

#### ***A. tumefaciens.***

Para el cultivo de *Agrobacterium*, se utilizó medio *Yeast Extract Peptone* (YEP). Se utilizaron como antibióticos selectivos rifampicina (50 mg/L), gentamicina (20 mg/L) o kanamicina (50 mg/L). La temperatura de cultivo fue de 30 °C.

## Medio YEP

Bacto™ yeast extract (Difco)	1% (p/v)
Bacto™ peptone (Difco)	1% (p/v)
KCl	0.5% (p/v)

Para preparar medio sólido, la mezcla se suplementaba con 1.5% (p/v) de Bacto™ Agar (Difco).

Levaduras.

*Cepas de levadura usadas.*

Las siguientes líneas de la levadura *S. cerevisiae* fueron utilizadas en este estudio:

Cepa	Genotipo	Referencia
<b>GRF167</b>	<i>MATα, ura3-167, his3-Δ200, GAL<sup>+</sup></i>	Curcio y Garfinkel, 1986 (293)
<b>AXT3K</b>	<i>MATα Δena1::HIS3::ena4 nha1::LEU2 nhx1::KanMX ura3-1 trp1 ade2-1 can1-100</i>	Quintero <i>et al.</i> , 2002 (273)
<b>JP837</b>	<i>MATα Δena1::HIS3::ena4 nha1::LEU2 nhx1::KanMX CYC1:[PGK1:SOS1:CYC1] ura3-1 trp1 ade2-1 can1-100</i>	Quintero <i>et al.</i> , 2002 (273)
<b>JP29</b>	<i>MATα Δcnb1::HIS3 Δhog1::TRP1 ura3-1 leu2-3 ade2-1 can1-100</i>	-
<b>Δfus3</b>	<i>MATα Δfus3::KanMX4 ura3-1 leu2-3 his3-1 met15Δ</i>	-
<b>Δste11</b>	<i>MATα his3Δ1 met15Δ0 ura3 Δ0 ste11::KanMX4</i>	-
<b>YPDahl55</b>	<i>W303-1A sak1Δ::KanMX Δelm1::KanMX Δtos3::TRP1</i>	-
<b>Δ3K4E</b>	<i>W303-1A Δsak1::KanMX Δelm1::KanMX Δtos3 Δena1::HIS3::ena4</i>	este estudio
<b>AXT5</b>	<i>MATα ena1-4::loxP nha1::hisG nhx1::KanMX4 ura3-1 leu2-3, 112 his3-11,15 trp1 ade2-1 can1-100</i>	este estudio (Elena García)

**AXT3K** es la cepa resultante de eliminar los principales transportadores de Na<sup>+</sup> necesarios para la tolerancia a la salinidad de *S. cerevisiae*: las ATPasas de Na<sup>+</sup> ENA1-4, el antiportador Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> NHA1, presentes en la membrana plasmática de la levadura (289–291), y el antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> de retículo endoplásmico NHX1 (292–294). Esta línea presenta un fenotipo de halosensibilidad severa y se ha utilizado en múltiples ocasiones en la caracterización funcional de proteínas transportadoras de Na<sup>+</sup> procedentes de plantas (273, 295). Para experimentos que requerían la selección por tres auxotrofías utilizamos la cepa **AXT5** producida durante este estudio por Elena García.

**JP837** es la línea producto de la integración en el cromosoma de la levadura del casete de expresión *PGK1:AtSOS1:CYC*, procedente del vector pSOS1-1 (273). Al tratarse de una única copia situada en el cromosoma, obtenemos una expresión del antiportador moderada y constitutiva en el fondo genético AXT3K.

**JP29**, ***Δfus3*** y ***Δste11*** son cepas derivadas de W303 que han sufrido una mutación en una proteína de la familia MAPK. Fueron utilizadas para determinar que quinasa de *S. cerevisiae* fosforilaba la serina-1136 de SOS1.

**YPDahl55** y su cepa derivada ***Δ3K4E*** se utilizaron como fondo genético para la interacción entre GRIK1 y SOS2. Al carecer de las tres quinasas activadoras de SNF1, la cepa YPDahl55 suponía el fondo genético necesario para observar el efecto de esta interacción. Para incrementar la sensibilidad de la línea a la sal, siguiendo el procedimiento de (289–291) truncamos la agrupación de genes ENA mediante la inserción del gen HIS3. Posteriormente, siguiendo el método de (296) contra-seleccionamos el gen TRP1 mediante el suplemento de ácido fluoroantranílico.

#### *Medios y condiciones de cultivos de levaduras.*

Todas las técnicas de manipulación y crecimiento de levaduras se llevaron a cabo conforme a lo descrito en (297, 298). La temperatura de crecimiento y cultivo fue 28 °C en todos los casos.

Los procedimientos de crecimiento y propagación de levaduras se realizaron en medio YPD.

#### Medio YPD

Bacto™ yeast extract (Difco)	1 % (p/v)
Bacto™ peptone (Difco)	2 % (p/v)
Glucosa	2 % (p/v)

Para preparar YPD sólido, se añadía al medio 2% (p/v) de Bacto™ Agar (Difco).

Como medio mínimo selectivo, utilizamos YNB, eliminando el aminoácido apropiado de la mezcla, dependiendo del genotipo de la cepa.

#### Medio YNB

YNB ( <i>Yeast nitrogen base</i> sin aminoácidos)	0.17% (p/v)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5% (p/v)
Glucosa	2% (p/v)

Para la preparación de YNB sólido se añadía al medio 2% (p/v) de Bacto™ Agar (Difco), ajustando el pH previamente a 6.5 con KOH.

Para los ensayos de crecimiento de levaduras en medio salino se utilizó el medio Arginina-Fosfato (AP), libre de cationes alcalinos (299).

## Medio AP

PO <sub>4</sub> H <sub>3</sub>	8 mM
L-Arginina	10 mM
SO <sub>4</sub> Mg	2 mM
CaCl <sub>2</sub>	0.2 mM
KCl	1 mM
Glucosa	2 % (p/v)
Oligoelementos (stock 100X)	1 % (v/v)
Vitaminas	1 % (v/v)

La composición del stock 1000x de oligoelementos:

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	50 mg/L
CuSO <sub>4</sub>	4 mg/L
KI	10 mg/L
Fe <sub>3</sub> Cl	20 mg/L
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	40 mg/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	20 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4 mg/L

Para evitar la contaminación del stock, se añadían algunas gotas de cloroformo al mismo.

Composición del stock de vitaminas:

Biotina	1 mL (0,2 mg/mL en etanol)/100 mL
Ácido nicotínico	4 mg/100 mL
Piridoxina	4 mg/100 mL
Tiamina	4 mg/100 mL
Ácido pantoténico	4 mg/100 mL

La solución de vitaminas se esterilizaba por filtración.

Este medio se suplementaba con 1 mM de KCl y la concentración de NaCl indicada en cada caso.

Para el mantenimiento a largo plazo de cepas de interés, se conservaron a -70 °C, tras añadirle un 15% de glicerol esterilizado a 1 mL de suspensión de células en medio de cultivo.

Material vegetal

*Especies y líneas vegetales*

#### ***A. thaliana***

Las siguientes líneas de *Arabidopsis* fueron utilizadas durante este estudio:

Línea	Origen
<b>Col-0</b>	Arabidopsis Biological Resource Center University (ABRC, Ohio State University, Ohio, EE.UU.)
<b><i>sos2-2</i></b>	Zhu et al., 1998
<b>SALK_073907</b> <b>(<i>mpk6-2</i>)</b>	Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC, University of Nottingham, Reino Unido)
<b>SALK_127507</b> <b>(<i>mpk6-3</i>)</b>	Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC, University of Nottingham, Reino Unido)
<b>SALK_062471C</b> <b>(<i>mpk6-4</i>)</b>	Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC, University of Nottingham, Reino Unido)
<b>SALK_004221</b> <b>(<i>mpk6-5</i>)</b>	Arabidopsis Biological Resource Center University (ABRC, Ohio State University, Ohio, EE.UU.)
<b><i>sos2-2 x mpk6-3</i></b>	cruce <i>sos2-2</i> con <i>mpk6-3</i> (laboratorio Dae-Jin Yun)
<b>SALK_142938</b> <b>(<i>grik1</i>)</b>	Arabidopsis Biological Resource Center University (ABRC, Ohio State University, Ohio, EE.UU.)
<b>SALK_015230</b> <b>(<i>grik2</i>)</b>	Arabidopsis Biological Resource Center University (ABRC, Ohio State University, Ohio, EE.UU.)



<b><i>grik1 x grik2</i></b>	cruce <i>grik1</i> con <i>grik2</i> (laboratorio Hiroaki Fuji)
<b>SALK_064029</b> <b>(<i>gso1-1</i>)</b>	Arabidopsis Biological Resource Center University (ABRC, Ohio State University, Ohio, EE.UU.)
<b>SALK_103965</b> <b>(<i>gso1-2</i>)</b>	Arabidopsis Biological Resource Center University (ABRC, Ohio State University, Ohio, EE.UU.)

### ***Nicotiana benthamiana***

Se utilizaron las hojas de *Nicotiana benthamiana* para la expresión transitoria de proteínas de *Arabidopsis* tras transformar con *Agrobacterium*.

Cultivo y crecimiento de *A. thaliana*.

*Medios de cultivo vegetal*

Medio Murashige y Skoog (MS) (300).

Macronutrientes (mM)		Micronutrientes (μM)	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	20,6	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	100
KNO <sub>3</sub>	18,5	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	100
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	3,0	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	100
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,5	EDTA- Na <sub>2</sub>	100
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	30
		KI	5
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1
		CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1
		CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,1

El medio se suplementaba con 30 g/L de sacarosa y era tamponado con 2,5 mM de MES. El pH se ajustaba a 5,7 con KOH. Para solidificarlo, se añadía 0,8-1% (p/v) de bactoagar (Difco).

Para la selección de líneas transgénicas de *Arabidopsis*, se suplementaba el medio con higromicina (20 mg/L).

Para observar el comportamiento de diferentes líneas en sal, se añadía a la solución la cantidad de NaCl necesaria.

#### *Medio LAK*

Macronutrientes (mM)		Micronutrientes (μM)	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2	MnSO <sub>4</sub>	10
MgSO <sub>4</sub>	1	ZnSO <sub>4</sub>	1
		CuSO <sub>4</sub>	1
		(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0,03
		Fe <sup>2+</sup> como <i>Sequestrene</i> 138-Fe	100

Los distintos nutrientes se disolvían en agua desionizada y el pH se ajustaba a 5,3 mediante KOH. Para los tratamientos de salinidad la cantidad correspondiente de NaCl era añadida mediante un stock de NaCl 5 M (301).

#### *Condiciones de crecimiento in vitro.*

Para mantener la esterilidad todos los procedimientos de manejo del material se realizaban en una campana de flujo laminar Telstar A-H. Los medios y soluciones se esterilizaban en el autoclave a 120°C y 1,2 atmósferas de presión durante 20 minutos.

Todo el material de manipulación como scalpels, pinzas o asas de siembras se esterilizaba con alcohol al 70% y altas temperaturas.

#### *Esterilización de semillas.*

Para esterilizar la superficie de las semillas se le aplicaba a cada alícuota de semillas una rutina de 2 minutos en agitación en etanol al 70%, 5 minutos de agitación en una solución con hipoclorito de sodio al 70% y un 1% de SDS. Posteriormente se aplicaban 5 lavados con agua desionizada esterilizada.

Para sincronizar la germinación, las semillas se estratificaban a 4 °C en oscuridad durante un periodo de entre 2 y 4 días antes de la siembra.

#### *Condiciones de crecimiento en suelo.*

El crecimiento en suelo se utilizó únicamente para la propagación de plantas y recolección de semillas.

Como sustrato se utilizó turba negra con perlita (COMPO SANA® Universal), esterilizada en el autoclave previamente a su uso.

Las plantas crecían en invernadero bajo un régimen natural de luz, suplementado con iluminación por lámpara de sodio durante 16 horas al día.

#### *Recolección de semillas.*

Para la recolección, las plantas se protegían con colectores de semillas comerciales *Aracons™* (Arasystem-Betatech, Bélgica) al florecer. Cuando la planta presentara silicuas maduras, se procedía a detener el riego de las mismas. Tras la desecación total, se cortaban las inflorescencias por la base y se procedía a la apertura

mecánica de las silicuas, recogiendo el total de semillas desprendidas y, mediante tamizaciones sucesivas, eliminando los restos vegetales sobrantes.

#### *Condiciones de crecimiento en cultivo hidropónico.*

Las semillas utilizadas se estratificaban a 4 °C durante un periodo de entre 2 y 4 días, tras lo cual eran colocadas individualmente sobre una matriz de lana de roca embebida en agua destilada soportada por un tubo de centrifuga al que se le había cortado el fondo.

Tras la germinación, los tubos eran transferidos a un contenedor plástico de 8 litros, donde se les añadía solución LAK: una modificación del medio de cultivo Long Ashton con una concentración de  $K^+$  de 1 mM y nominalmente libre de sodio y amonio (301).

Tras la primera semana de crecimiento, se renovaba el medio de cultivo y se añadía el tratamiento salino correspondiente, disolviendo una solución 5 M de NaCl hasta la concentración deseada. La solución y el tratamiento eran renovados semanalmente.

Todo el sistema de cultivo se encontraba dentro de una cámara de cultivo en régimen de día largo (16/8 horas de luz/oscuridad), con una PAR (radiación fotosintética activa) de  $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperaturas de 25/20 °C y una humedad relativa de 40/60%. Para mantener una correcta aireación a la solución nutritiva, el contenedor contaba con una bomba de acuario que inyectaba aire a la base del mismo.

#### *Cultivo y crecimiento de *Nicotiana benthamiana*.*

Las plantas de *Nicotiana* crecían en recipientes individuales de sustrato COMPO SANA Universal en cámaras de cultivo bajo un régimen de día largo (16/8 h de luz/oscuridad), a 25 °C y 70% de humedad.

## Transformaciones

### Vectores.

Los vectores utilizados se recogen en el Anexo 3.

### Transformación de bacterias.

#### *Preparación de células competentes.*

#### *E. coli.*

Para la preparación de células competentes nos basamos en (302).

Partiendo de una pequeña porción de biomasa (2-5 colonias), se inoculaban 200mL de medio SOB en un matraz de 2 L. El cultivo se crecía a baja temperatura (18 °C) y agitación vigorosa (200 rpm) hasta alcanzar una D.O. 600 nm entre 0,4 y 0,6. Este paso debía tomar al menos 30 horas para obtener unos resultados de eficiencia de transformación óptimos.

Una vez obtenido un cultivo en ese estadio de crecimiento, se recogía el mismo por centrifugación suave (3000 rpm durante 15 minutos a 4 °C). El centrifugado era disuelto en 67 mL (1/3 del volumen original) de solución de transformación fría y se incubaba en hielo durante 10 minutos. Tras la incubación, se repetía el proceso de centrifugación-resuspensión-incubación, esta vez en 16mL (1/12,5 del volumen original) de solución de transformación suplementada con un 7% (v/v) de DMSO.

La solución de células resultante se dispensaba en alícuotas de 50-100 µL, que se congelaban instantáneamente introduciéndose en N<sub>2</sub> líquido, tras lo cual se almacenaban a -70 °C.

### *Solución de transformación*

PIPES (ácido etanosulfónico-PIP)	10 mM
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	15 mM
KCl	250 mM

El pH se ajustaba a 6,7 mediante KOH 5 N, tras lo cual se añadían MnCl<sub>2</sub> 55 mM.

La solución se esterilizaba mediante filtración (0,22 µm) y se conservaba a 4 °C.

### *A. tumefaciens*

Para esta preparación seguimos el método de (303).

Se inoculaban una colonia de la línea deseada en 5 mL de medio YEP y se incubaba a 28 °C durante toda la noche. Se tomaban 2 mL de este cultivo y se inocularon 80mL del mismo medio a 28 °C, hasta alcanzar una D.O. 600 nm de entre 0,5 y 1.

Las células producidas se recogían por centrifugación a 3000 g y 4 °C durante 10 minutos, tras lo cual se lavaban con ½ volumen de glicerol 10% (v/v) previamente esterilizado y enfriado. Este procedimiento se repetía en dos ocasiones más, resuspendiendo en 4mL en el primer paso y 1,5 mL en el paso final de centrifugación. Finalmente, las células se dispensaron en alícuotas de 100 µL, congeladas instantáneamente mediante su inmersión en N<sub>2</sub> líquido. Para su conservación se mantenían a -70 °C.

### *Transformación de E. coli.*

A una alícuota de 50-100  $\mu\text{L}$  de células competentes se le añadía 10-100 ng de ADN en un volumen inferior a 10  $\mu\text{L}$ . Se incubaba en hielo durante 30 minutos y se sometían a un choque térmico de 42 °C durante 30 segundos, devolviéndose inmediatamente después al hielo donde se incubaba durante 5 minutos.

Tras la incubación se añadían 900-950  $\mu\text{L}$  de medio LB y las células se mantenían durante 40-60 minutos a 37 °C.

Posteriormente el cultivo se centrifugaba a baja velocidad y se resuspendía en un volumen pequeño de LB, que se sembraba y extendía en placas de LB con el antibiótico selectivo adecuado mediante esferas de cristal esterilizadas.

Si era necesaria la detección de plásmidos recombinantes mediante la inactivación de la  $\beta$ -galactosidasa, se extendían en la placa 4  $\mu\text{L}$  de IPTG (200 mg/mL) y 40  $\mu\text{L}$  de X-Gal (20 mg/mL) previamente a la siembra de las células transformadas (304).

Los transformantes se confirmaban mediante una restricción enzimática de una preparación de ADN plasmídico del transformante.

### *Transformación de Agrobacterium.*

Las *A. tumefaciens* utilizadas fueron transformadas mediante electroporación.

Se añadía 50 ng de ADN plasmídico a un con 100  $\mu\text{L}$  de células competentes y se incubaban en hielo durante 3 minutos. Se transfería el cultivo a una cubeta de electroporación comercial (Gene Pulser®/MicroPulser™, Biorad) y se aplicaba el pulso en un electroporador (MicroPulser™ Electroporator, Biorad), utilizando las condiciones óptimas para la transformación de *A. tumefaciens* que establecía el fabricante.

Tras el pulso, se recogían las células en 2 mL de medio YEP y se incubaba durante 3 horas a 30 °C y agitación leve. Para la selección de transformantes, se

sembraban y extendían 100 µL del cultivo en medio YEP sólido suplementado con el antibiótico selectivo apropiado.

#### *Transformación de levaduras.*

Para la transformación de levaduras se utilizó el método descrito en (305).

Para ello se inoculaba una colonia de la estirpe apropiada en 10 mL de YPD y se crecía durante toda la noche a 30 °C y agitación suave.

Se recogían por centrifugación alrededor de  $2 \times 10^8$  células ( $D.O_{.600nm} = 0,5$  es equivalente a  $5 \times 10^6$  células/mL) y se les añadía entre 1 y 2 µg de ADN y 500 µL de solución PLATE, mezclando brevemente.

Las células se incubaban en esta solución durante 24 horas a temperatura ambiente o alternativamente durante 40 minutos a 42 °C. Para la integración en el genoma de la levadura de fragmentos de ADN por recombinación homóloga, el paso de incubación a temperatura ambiente se mantenía durante 48 h y se utilizaba ADN linealizado.

Tras el periodo de incubación, la mezcla se centrifugaba para recoger las células, que se resuspendían en 100 µL de medio YNB y se extendían en placas con medio selectivo, donde se incubaban a 28 °C durante 48 horas.

#### *Solución PLATE*

PEG (MW 3350) 45%	40,5% (v/v)
Acetato de litio	100 mM
Tris-HCl pH:7,5	10 mM
EDTA pH:8	1 mM



### *Transformación de plantas.*

#### *Transformación de A. thaliana.*

Para transformar *Arabidopsis* se utilizó el método de inmersión floral (*floral dipping method*) (306).

Para ello, se crecían las plantas en suelo, bajo régimen de luz de día largo, hasta inducir la floración. Para maximizar el número de inflorescencias, se cortó el primer tallo floral, lo que promueve el crecimiento de tallos florales secundarios desde la roseta. Tres días antes de la infiltración, se eliminaban todas las flores maduras para reducir la presencia final de semillas no transformadas.

El proceso de transformación consistía en la inmersión de las inflorescencias durante 30 segundos en una suspensión de células de *A. tumefaciens* con sacarosa 5% (p/v) y Silwet L-77 al 0,02% (v/v) como agente tensioactivo.

Tras la inmersión, se recubrían las plantas completas con bolsas de plástico para mantener la humedad en las zonas agroinfiltradas y se mantenían en el invernadero. Tras dos días se eliminaban la recubierta y se permitía el desarrollo de las plantas hasta la maduración de las silicuas, momento en el cual se detuvo la irrigación, recogiendo finalmente las semillas.

La selección de semillas transformantes ( $T_1$ ) se realizaba por siembra en medio MS suplementado con 20  $\mu\text{g/mL}$  de Higromicina B. Las plantas resistentes se transferían a suelo cuando presentaban 4-5 hojas verdaderas y las semillas producidas ( $T_2$ ) volvían a sembrarse en Higromicina 20  $\mu\text{g/mL}$  donde se seleccionaba una segregación 3:1 del marcador de resistencia.

Las plantas  $T_2$  que presentaban una segregación adecuada se propagaron en tierra, seleccionando las descendientes  $T_3$  homocigotas mediante recuento de resistentes en placas MS Higromicina.

Para la agroinfiltración de *N. benthamiana* se siguió el protocolo descrito en (307).

Se inoculaba una colonia que portara la construcción de interés en 5 mL de medio YEP suplementado con los antibióticos selectivos correspondientes y se crecía durante toda la noche a 30 °C con agitación suave. En paralelo se realizaba el mismo procedimiento con la línea p19

Al día siguiente, se medía la densidad óptica de los cultivos y se calculaban los volúmenes necesarios para obtener una D.O.<sub>600nm</sub> en la mezcla de transformación final de **0,5** (para las líneas con construcciones) o **0,3** (para p19), siguiendo la fórmula:

$$V = (V_{\text{final}} \times \text{D.O.}_{600\text{nm}}_{\text{final}}) / \text{D.O.}_{600\text{nm}}_{\text{inicial}}$$

Se añadían los volúmenes de ambos cultivos a un tubo Falcon®, y se centrifugaban a 5000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante era eliminado y las células resuspendidas en el volumen final deseado de tampón de activación. La mezcla se incubaba durante 2 horas a temperatura ambiente.

Tras este periodo, se tomaba la mezcla de transformación en jeringuillas de 5 mL sin aguja y se infiltraba el envés de hojas de *N. benthamiana*, asegurando una distribución homogénea de la mezcla por toda la superficie de la hoja.

Para una eficiente infiltración de las plantas, éstas debían tener entre 5 y 6 semanas y encontrarse bien hidratadas en el momento de la transformación.

MES	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
Acetosiringona	120 µM

## Caracterización de levaduras.

### Ensayos de crecimiento de levaduras.

La tolerancia de los distintos transformantes de levaduras a diferentes concentraciones de sal se determinaba mediante la observación de su capacidad de formar colonias en medio AP sólido.

Para ello se inoculaban los distintos transformantes en 2 mL de medio mínimo YNB y se incubaban a 30 °C hasta saturación ( $D.O_{600nm} \approx 2-5$ ), procurando una D.O. homogénea entre todos los cultivos al realizar el ensayo.

A estos cultivos se les realizaban diluciones seriadas 1:10 y se sembraban gotas de 5 µL de cada una de ellas en placas de AP suplementadas con NaCl a la concentración indicada en cada caso. Incluyéndose en todos los casos una placa control sin NaCl. Estas placas eran incubadas a 28 °C durante un periodo de tiempo variable dependiendo del fenotipo (entre 3 y 5 días).

## Caracterización de *Arabidopsis*.

### Caracterización fenotípica de líneas de *A. thaliana* en cultivo hidropónico.

#### *Tolerancia a salinidad*

Las distintas líneas estudiadas fueron crecidas en medio hidropónico como se describe en la sección M1.3.2.

8 plantas de cada línea, homocigotas para la mutación correspondiente, fueron crecidas en medio LA-K suplementado con 1 mM de KCl. Tras una semana, se añadía la concentración de sal indicada en cada tratamiento experimental. Tras 3 semanas de tratamiento, las plantas se recogían y se realizaban las mediciones oportunas.

#### *Caracterización fenotípica de plantas de Arabidopsis.*

Tras finalizar el tratamiento aplicado, las plantas eran fotografiadas y tras eliminar las raíces, se introducían en un tubo de ensayo tarado previamente para determinar su peso fresco. Posteriormente se almacenaban en una estufa a 42 °C durante 1 semana, tras lo cual se determinaba su peso seco.

#### *Caracterización fenotípica de líneas de A. thaliana en cultivo in vitro.*

Para todos los ensayos de crecimiento in vitro se utilizaron semillas en homocigosis para la mutación estudiada. Previamente esterilizadas siguiendo el método descrito en la sección “*Esterilización de semillas*”.

#### *Germinación y supervivencia.*

Para la determinación del comportamiento en germinación, se sembraron 20 semillas de cada línea en placas de MS o MS suplementado con 50 mM de NaCl.

Tras una semana en una cámara de crecimiento a 25 °C y un régimen de luz de día largo (18 h luz/6 h de oscuridad) se cuantificaban las semillas germinadas. Tras 10 días se contabilizaban el número de plantas con un fenotipo de tolerancia o sensibilidad al tratamiento.

#### *Elongación de raíz.*

Para determinar el grado de elongación de raíz, se germinaron 20 plantas de cada línea transformante en MS, tras lo cual fueron transferidas a placas frescas de MS o MS suplementado con 100 mM de NaCl.

Tras 12 días de crecimiento a 25 °C en un régimen de luz de día largo (16 h luz/8 h oscuridad) se midió la longitud de la raíz primaria de la planta.

#### Medición del contenido iónico

Para determinar los contenidos en sodio y potasio, se crecieron plantas en suelo durante tres semanas, en un régimen de 16 h de luz/8 h de oscuridad a 23 °C. Tras este periodo, se añadió al agua de riego NaCl 150 mM durante 10 días.

El material cosechado se secó a 80 °C durante 48 horas, tras lo cual se pesó y se le aplicó 300 °C durante 1 hora y 575 °C durante 4 horas en un horno de mufla. El material obtenido se disolvió en 0,1 M de HCl. El contenido de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> se determinó mediante espectrofotometría de absorción atómica (Hitachi Z-5000).

#### Manipulación de ácidos nucleicos.

##### Purificación y análisis de ADN.

Todo el material de vidrio o plástico utilizado en estas técnicas se esterilizó por autoclave 20 minutos a 120 °C y 2 atm de presión antes de su uso. Las soluciones se esterizaron por autoclave en las mismas condiciones. En el caso de las soluciones termolábiles se esterilizó el material por filtración (0,22 µm). Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada MilliQ (Millipore®).

## *Purificación de ADN plasmídico.*

### *E. coli.*

#### Minipreparación de ADN plasmídico (miniprep)

Se utilizó el método de lisis alcalina (304).

Se inoculaba una colonia de células de *E. coli* transformada con el plásmido de interés en 3 mL de medio LB líquido, suplementado con el antibiótico selectivo correspondiente.

Se recogían las células por centrifugación y se resuspendían en 100 µL de solución I/GTE. A la suspensión de células se le añadía 200 µL de solución II, se invertía suavemente entre 6 y 8 veces y se incubaba en hielo durante 5 minutos. Posteriormente, se añadían 150 µL de solución III y se homogeneizaba la mezcla por inversión, tras lo cual se incubaba en hielo durante 20 minutos.

La mezcla se centrifugaba a 13000 rpm durante 10 minutos, y se transfería el sobrenadante a un nuevo tubo de centrifuga, donde se precipitaba el ADN mediante la adición de 2 volúmenes (1 mL) de Etanol 100%. Los tubos se incubaban en hielo durante 10 minutos para posteriormente centrifugarse a 13000 rpm durante 10 minutos. Se retiraba el sobrenadante y se resuspendía el precipitado de ADN en 100 µL de solución IV, a la cual se añadían 2 volúmenes de Etanol 100%, y tras incubar en hielo durante 10 minutos, se procedía a centrifugar 10 minutos a 13000 rpm.

Tras retirar el sobrenadante, se dejaba secar el precipitado de ADN, tras lo cual se resuspendía en TE (1:10).

#### Solución I / GTE

Tris	25 mM
EDTA pH8	10 mM
Glucosa	1% (p/v)

#### Solución II

NaOH	200 mM
SDS	10%

#### Solución III

AcNa pH 4,8	3 M
-------------	-----

#### Solución IV

AcNa pH4,8	60 mM
Tris-HCl pH8	30 mM

Cuando el ADN purificado tenía como objetivo operaciones que requerían un grado de pureza más elevado en la preparación final como secuenciaciones o transformaciones por electroporación, utilizábamos un kit de purificación de ácidos nucleicos comercial (NucleoSpin® Plasmid Kit, Macherey-Nagel), siguiendo en este caso las instrucciones indicadas por el fabricante.

#### Maxipreparación de ADN plasmídico (maxiprep)

Se inoculaba una colonia transformada con el plásmido de interés en 100 mL de medio LB y se crecía durante una noche a 37 °C y agitación.

El cultivo crecido se centrifugaba a 5000 rpm durante 10 minutos, resuspendiéndose las células en 5 mL de tampón GTE suplementado con 100 µL de lisozima al 5% (p/v) comercial (Sigma). La suspensión celular se incubaba en hielo durante 10 minutos, tras lo cual se añadían 10 mL de solución II, mezclándose por inversión entre 8 y 10 veces. El lisado celular producto de esta mezcla se incubaba en hielo durante 10 minutos, y posteriormente se le añadían 7,7 mL de acetato potásico 3 M pH 4,8. Tras mezclar por inversión, se incubaba en hielo durante 30 minutos,

precipitando así el floculo de SDS, proteínas y ADN cromosómico. Tras este periodo, se centrifugaban los tubos a 15000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.

Para eliminar completamente los restos celulares, se filtraba el sobrenadante fruto de esta centrifugación utilizando una tela filtradora comercial Miracloth (Calbiochem).

A la solución filtrada se le añadía 1 volumen de isopropanol y se incubaba en hielo durante 20 minutos, precipitando así los ácidos nucleicos. Los tubos se centrifugaban a 10000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, tras lo cual, se eliminaba el isopropanol y el precipitado se resuspendía en 2,5 mL de TE (1:10) pH 8.

Posteriormente se añadían 2,5 mL de LiCl 6 M a la mezcla y se incubaba en hielo durante 15 minutos, precipitando así el ARN presente en la solución. Los tubos se centrifugaban a 10000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se traspasaba a un nuevo tubo, donde se le añadía 1 volumen de isopropanol y se incubaba en hielo durante 20 minutos, tras lo que se centrifugaba nuevamente a 10000 rpm durante 10 minutos.

El precipitado se resuspendía en 750 µL de TE (1:10) pH8 y transvasado a un tubo de centrifuga de 2 mL, dónde se le añadían 10 µL de ARNasa al 1% (v/v) y se incubaba 15 minutos a 37 °C.

Para eliminar los restos de proteína presente se procedía a tratar la mezcla con 750 µL de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), que se homogeneizaba mediante vórtex y se centrifugaba a 13000 rpm durante 10 segundos. La fase acuosa era trasvasada a un nuevo tubo donde se repetía el tratamiento con fenol:cloroformo:isoamílico. La fase acuosa se traspasaba a otro tubo, donde se le añadía 75 µL de acetato de sodio 3 M y 750 µL de isopropanol. La mezcla resultante se incubaba durante 20 minutos en hielo y se centrifugaba a 13000 rpm durante 10 minutos. Se procedía a retirar el isopropanol y se resuspendía el precipitado de ADN plasmídico en 200 µL de TE (1:10) pH 8. Se añadían entonces 700 µL de etanol:acetato de amonio 7,5 M (6:1) y se incubaba 10 minutos en hielo, se aplicaba a la mezcla un



pulso de centrifuga, se eliminaba el sobrenadante y, por último, se lavaba el precipitado con 1 mL de etanol al 70%.

Se permitía el secado del precipitado y se disolvía el ADN plasmídico purificado en el volumen de TE (1:10) pH8 deseado (200-400 µL).

#### Levaduras.

Para la extracción de ADN plasmídico de levaduras, se inoculaba una colonia aislada en 10 mL de medio YNB, con la composición de aminoácidos adecuada para la selección por auxotrofia, y se crecía durante toda la noche a 30 °C con agitación. El cultivo se centrifugaba a 5000 rpm durante 5 minutos, y las células precipitadas se resuspendían en 500 µL de sorbitol 1M, EDTA 0,1 M pH7,5 y se pasaban a un tubo de centrifuga de 2 mL. Allí se añadía a la suspensión celular 20 µL de liticasa (5 mg/mL en KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,5) y se incubaba la reacción a 37 °C durante 1 hora.

Posteriormente la mezcla se centrifugaba a 13000 rpm y el precipitado se resuspendía en 0,5 mL de Tris 50 mM pH 7,4 EDTA 20 mM. Tras homogeneizar la mezcla, se añadían 200 µL de acetato de potasio 5 M y se incubaba 1 hora en hielo. Se centrifugaba durante 5 minutos a 13000 rpm y se traspasaba el sobrenadante a un nuevo tubo.

Para precipitar el ADN contenido en la muestra se añadía 1 volumen de isopropanol y tras mezclarse, se incubaba en hielo durante 5 minutos, tras lo cual se centrifugaba a 13000 rpm durante 1 minuto. El precipitado resultante se secaba y resuspendía en buffer TE (10:1). Para amplificar el ADN purificado se transformaban células competentes de *E. coli*.

### *Purificación de ADN genómico.*

#### *Purificación de ADN genómico de levaduras.*

Para la extracción del ADN genómico de la levadura, seguíamos un procedimiento muy similar al de purificación de ADN plasmídico.

Se inoculaba una colonia aislada en 5 mL de medio YPD y se crecía durante toda la noche a 30 °C con agitación. El cultivo se centrifugaba a 5000 rpm durante 5 minutos, y las células precipitadas se resuspendían en 500 µL de sorbitol 1M: EDTA 0,1 M pH 7,5 y se pasaban a un tubo de centrifuga de 2 mL. Allí se añadía a la suspensión celular 20 µL de liticasa (5 mg/mL en KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH7,5) y se incubaba la reacción a 37 °C durante 1 hora.

Tras la digestión de la pared celular, la suspensión se centrifugaba a 13000 rpm y el precipitado se resuspendía en 0,5 mL de Tris 50 mM pH7,4: EDTA 20 mM y se añadían 50 µL de SDS al 10%, tras lo cual se calentaba la muestra a 65 °C durante 30 minutos.

Tras este tratamiento, se añadían 200 µL de acetato de potasio 5 M y se incubaba 1 hora en hielo. Se centrifugaba durante 5 minutos a 13000 rpm y se traspasaba el sobrenadante a un nuevo tubo.

Para precipitar el ADN contenido en la muestra se añadía 1 volumen de isopropanol y tras mezclarse, se incubaba en hielo durante 5 minutos, tras lo cual se centrifugaba a 13000 rpm durante 1 minuto. El precipitado resultante se secaba y resuspendía en 500 µL de buffer TE (50:20), que eran tratados con ARNasas a 37 °C durante 15 minutos.

La muestra se centrifugaba 15 minutos a 10000 rpm y el sobrenadante se trasvasaba a un nuevo tubo de centrifuga, donde se le añadía 1 volumen de isopropanol y 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M, se incubaban 5 minutos en hielo y se centrifugaba 1 minuto a 10000 rpm. Tras secar el precipitado, se resuspendía en TE (10:1) pH 7,4.

## Purificación de ADN genómico de *Arabidopsis*.

Para la purificación de ADN genómico de *Arabidopsis* seguimos el método de Edwards et al. (1991) (308) con algunas modificaciones.

Se tomaban hojas frescas de plántulas jóvenes (aproximadamente unos 100 mg) e, introduciéndose en un tubo de centrifuga, se congelaban inmediatamente, mediante inmersión en N<sub>2</sub> líquido. Cuando el cultivo se encontraba congelado, procedíamos a su pulverización utilizando émbolos de plástico esterilizados.

Una vez obtenido un polvo homogéneo, añadíamos 400 µL de Tampón de Extracción pre-calentado a 65 °C y 400 µL de cloroformo, se homogeneizaba la mezcla mediante vórtex y se calentaba a 65 °C durante 5 minutos.

Tras el tratamiento con el tampón, se eliminaban los restos celulares mediante centrifugación (13000 rpm durante 10 minutos). Los ácidos nucleicos presentes en el sobrenadante resultante se precipitaban mediante la adición de 1 volumen de isopropanol y se enfriaban en hielo durante 20 minutos, tras lo cual se centrifugaban durante 15 minutos a 13000 rpm. El precipitado se lavaba con etanol al 70%, se dejaba secar y se resuspendía en 50 µL de agua MilliQ esterilizada.

### *Tampón de extracción*

d-Sorbitol	140 mM
Tris-HCl pH8	220 mM
EDTA-Na <sub>2</sub> pH8	22 mM
NaCl	800 mM
CTAB	0.8% (p/v)
n-Laurilsarcosina	1% (p/v)

## Precipitación del ADN.

Para aumentar la concentración de las muestras de ADN se utilizaron los siguientes métodos:

### *Precipitación con etanol-acetato de sodio.*

Se añadía a la solución de ADN 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y dos volúmenes de etanol absoluto. Se incubaba la muestra en hielo durante 20 minutos, tras lo cual se centrifugaba durante 10 minutos a 13000 rpm. El ADN precipitado se lavaba con etanol al 70%, se secaba y se resuspendía en el volumen requerido de TE o agua.

### *Precipitación con etanol-acetato de amonio.*

Siguiendo los mismos pasos indicados en el procedimiento anterior, la solución inicial de ADN se trata con 3,5 volúmenes de una solución de etanol-acetato de amonio (1 volumen de acetato de amonio 7,5 M por 6 volúmenes de etanol absoluto).

Para ambos casos el etanol podía ser sustituido por isopropanol, reduciendo el volumen del alcohol a la mitad.

## Cuantificación del ADN.

La concentración de las muestras de ADN se cuantificaba utilizando un espectrofotómetro comercial NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.).

## Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Para todas las operaciones de electroforesis de ácidos nucleicos se siguieron las instrucciones de (304). Los geles de agarosa se preparaban disolviendo un 0,8 – 1% (p/v) de agarosa en tampón TBE 0,5x (45 mM Tris/borato, 1 mM EDTA) como uso general o TAE 1x (40 mM Tris/acetato, 1 mM EDTA) en caso de aplicar algún procedimiento posterior sobre los ácidos nucleicos. El gel se suplementaba con 0,05 µg/mL de bromuro de etidio, para la tinción UV del ADN.

Antes de cargar las muestras, se añadía a la solución de ADN tampón de carga 5x (30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol, 10 mM EDTA).

El gel se sumergía en el buffer TBE o TAE 1x con 0,05 µg/mL de bromuro de etidio y se aplicaba una diferencia de potencial entre 70-120V.

Las fotografías al gel se realizaban con el sistema de transiluminación ChemiDoc™ XRS Gel (Bio-Rad), utilizando el software Quantity One® (Bio-Rad) para el tratamiento de imágenes y estudios de densitometría de bandas.

## *Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa.*

Para la extracción del ADN de la matriz de gel de agarosa se utilizaba el kit comercial NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

## Manipulación enzimática del ADN.

### *Digestión del ADN con enzimas de restricción.*

Todas las digestiones con endonucleasas de restricción se realizaron utilizando los tampones y las condiciones recomendadas por el fabricante. De disolvía el ADN a

una concentración de 50-100 µg/µL en volúmenes de 50 µL, añadiendo al menos 1 U de enzima por µg de ADN.

Posteriormente se incubaba la reacción durante 1 hora a la temperatura indicada para cada enzima.

En caso de necesitar alguna manipulación, los productos de la digestión se separaban mediante electroforesis en gel de agarosa y el fragmento de interés se aislaba como se describe en *Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa*.

#### *Defosforilación de extremos 5' de ADN.*

Para evitar la religación del vector en la construcción de determinados plásmidos, se procedió a eliminar los grupos fosfato en los extremos 5' de los sitios de digestión por endonucleasas.

Para ello se añadía 1-2 U de fosfatasa alcalina de camarón (SAP) (Roche) a la mezcla de reacción tras finalizar el proceso de digestión. Se incubaba la solución durante 20-30 minutos a 37 °C, tras lo cual las enzimas de la reacción eran desactivadas mediante una incubación a 65 °C durante 15 minutos. Alternativamente, se eliminaban las proteínas de la solución de ADN, añadiendo a la misma 4 µL de EDTA 0,5 M y 10 µL de SDS10%, llevando el volumen hasta 100 µL con agua y añadiendo 1 volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (24:24:1), seguida de una precipitación del ADN de la fase acuosa con etanol-acetato sódico.

#### *Generación de extremos romos de ADN.*

Si en un proceso de clonación era necesaria la generación de un extremo romo para permitir la ligación de dos fragmentos sin sitios de restricción compatibles, se procedía a tratar el fragmento de ADN resultante de la digestión con Klenow, el fragmento grande de la ADN polimerasa I, que eliminaba o rellenaba los extremos

resultantes de la digestión mediante sus actividades polimerasa 5' -> 3' y exonucleasa 3' -> 5'. La enzima utilizada era comercial (New England BioLabs®) y para su uso se siguieron las instrucciones del fabricante.

#### *Ligación de fragmentos de ADN.*

Para la ligación de fragmentos de ADN, se utilizaba una proporción molar 3:1 de inserto:vector para ligaciones de fragmentos cohesivos y 10:1 para fragmentos romos.

Se preparaba una reacción de 20 µL que, junto al ADN purificado, contenía 1U de ligasa de ADN T4 (Invitrogen™, Alemania) y 4 µL de tampón de ligación comercial.

Para ligaciones de extremos romos se incubaba la reacción a 14 °C durante toda la noche. Para extremos cohesivos se realizaba a temperatura ambiente durante 2-3 horas.

Para amplificar los plásmidos ligados, se tomaban 10 µL de la mezcla de reacción y se transformaban células competentes de *E. coli*.

Para la ligación de productos de PCR, se utilizó el sistema comercial de clonación pSpark® DNA cloning system (Canvax). Siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### *Amplificación por PCR de fragmentos de ADN.*

#### *Cebadores de oligonucleótidos.*

Los cebadores de reacción utilizados en este trabajo fueron sintetizados en Sigma-Genosys. Todas las secuencias y detalles de los oligonucleótidos utilizados se encuentran recogidos en Anexo 2.

#### *Amplificación con la polimerasa de ADN Taq.*

Cada reacción contenía ~ 100 ng de ADN, 0,25 µM de cada cebador, 0,2 mM de dNTPs (dATP + dCTP + dGTP + dTTP, Deoxynucleotides Set (5prime, Alemania)), 2,5-5 µL de tampón Taq 10x descrito en Sambrook et al. (1989) (304) y 0,5-1 U de polimerasa Taq en un volumen de 25-50 µL.

El ciclo estándar de amplificación consistía en un paso inicial de desnaturalización del ADN (5' a 95 °C) seguidos de 25 o 30 ciclos consistentes en: 30'' a 95 °C, 35'' a una temperatura variable dependiendo de la temperatura de alineamiento del oligonucleótido (entre 40 °C y 60 °C) y ~90'' a 72 °C para la síntesis de ADN (1' por cada Kb de ADN a amplificar). Concluidos esos ciclos, se aplicaban 5' a 72 °C para una extensión final de la secuencia. Los productos de PCR producidos se utilizaban inmediatamente o se conservaban a -20 °C.

#### *Tampón Taq 10x*

KCl	500 mM
Tris-HCl pH8,3	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	15 mM
Gelatina	0,1%(p/v)

#### *Amplificación con polimerasas de alta fidelidad.*

Cuando era necesario que el ADN producido en la amplificación no presentará mutaciones, utilizábamos la polimerasa de alta fidelidad comercial VELOCITY DNA Polymerase (Bioline, Reino Unido), siguiendo las instrucciones del fabricante.



#### *PCR de colonias bacterianas.*

En ocasiones, para realizar una primera criba en la selección de transformantes de *E. coli* o *A. tumefaciens*, se procedía a realizar una reacción de PCR utilizando como molde biomasa bacteriana, obtenida de las placas de siembra.

Este proceso se realizaba de manera similar a las reacciones de PCR con Taq, añadiendo a la mezcla una cantidad mínima de la colonia a examinar, obtenida mediante un toque sutil con un palillo esterilizado.

En este proceso es crucial no rebajar de 5' el proceso de desnaturalización inicial, para asegurarse de que las células se han lisado correctamente y liberado a la reacción el ADN molde a amplificar.

#### *Mutagénesis dirigida por PCR.*

Todas las versiones mutantes obtenidas en este trabajo se produjeron mediante PCR dirigida.

Para ello, se realizaban dos reacciones de PCR sobre la secuencia a mutagenizar, produciendo dos secuencias flanqueantes al sitio de mutación y portadoras de la misma. Tras purificar los fragmentos mutantes, se realizaba una segunda reacción de amplificación donde los dos fragmentos anillaban entre sí, permitiendo la reconstitución del fragmento original mutado al añadir cebadores de los extremos exteriores de ambos fragmentos.

Todas estas reacciones se realizaban con polimerasas comerciales de alta fidelidad.

## Secuenciación de ADN.

Todas las reacciones de secuenciación de ADN se realizaron por la compañía Secugen (CIB, Madrid) o STABvida (Campus FCT UNL, Caparica), siguiendo las instrucciones del operador en cada caso.

## Producción, purificación y análisis de proteínas.

### Producción de proteínas recombinantes desde bacteria.

Todas las proteínas purificadas desde *E. coli* en este trabajo se encontraban clonadas en el vector pGEX4-T2, perteneciente a la serie de vectores pGEX (GE Healthcare).

Estos vectores permiten purificar desde *E. coli*, proteínas fusionadas a la glutatión-S-transferasa de *Schistosoma japonicum*, bajo el control del promotor inducible *tac*.

El plásmido pGEX con la construcción de interés se transformaba en la cepa de *E. coli*, BL21, y con una colonia de la misma se pre-inoculaba 5 mL de medio LB suplementado con Ampicilina 100 µg/mL, que se crecía durante toda la noche a 37 °C con agitación. Posteriormente se inoculaban 200-500 mL del mismo medio con el pre-inoculo y se dejaba crecer hasta alcanzar una D.O. 600 nm de aproximadamente 0,7. En este punto se inducía la síntesis de proteína, añadiendo 0,5 mM de IPTG e incubando la muestra a 37 °C y agitación durante un tiempo variable, determinado previamente, para obtener un punto óptimo en la expresión (generalmente entre 3 y 4 horas).

Tras ese periodo de incubación, se procedía a recoger las células por centrifugación (10' a 7000 g, 4 °C), y se resuspendían en 15 mL de tampón de lisis.

A continuación, se procedía a sonicar la suspensión celular, manteniendo el tubo sumergido en hielo durante todo el proceso. Se aplicaban 10 ciclos de 30'' de

pulso de sonicación y 30'' de mantenimiento, para prevenir un posible calentamiento de la muestra. Posteriormente, se centrifugaban los restos celulares (10' a 10000 rpm).

Para aislar la proteína purificada del lisado celular se realizaba un tratamiento de cromatografía de afinidad, utilizando la resina comercial Glutation-Sefarose 4B (GE Healthcare). Para ello, se ponía en contacto el total del lisado celular con el volumen requerido (150-200 µL) de la suspensión de glutatión-sefarosa, previamente equilibrada con PBS 1X, y se incubaba a 4 °C y agitación suave durante 2-3 horas.

Transcurrido ese periodo, se eliminaba el sobrenadante y se empaquetaba la resina en una columna desechable de cromatografía (Bio-Spin®, Bio-Rad). Se procedía a lavar la matriz de 5 a 10 veces con un volumen de matriz de PBS 1X.

Para eluir la proteína, se añadían y recogían secuencialmente volúmenes de matriz de tampón de elución y se recogían distintas fracciones, para asegurarse un desprendimiento total de la proteína de la columna de afinidad.

La cantidad y pureza de proteína en las distintas fracciones era monitorizada mediante SDS-PAGE. En caso de obtenerse varias fracciones con alta cantidad de proteína pura, se procedía a dializar las distintas muestras, concentrándolas en una única alícuota.

#### *Tampón de lisis*

Tris HCl pH:8	50 mM
NaCl	50 mM
EDTA	5 mM
Leupeptina	1 µg/ml
pepstatina	1 µg/ml
PMSF	0,15 mM
DFP	1 mM
2-ME	1 mM

#### *Tampón de elución*

Tris-HCl pH 8	10 mM
GSH	10 mM
Glicerol	10% (v/v)

#### *PBS*

NaCl	140 mM
KCl	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM

#### Producción de proteínas recombinantes desde levadura.

Para la producción de proteínas en *S. cerevisiae*, se utilizó el vector pEG(kt) (309) diseñado para la expresión y purificación en células eucariotas de proteínas fusionadas a la glutatión-S-transferasa (GST). El gen fusionado se encuentra bajo el control transcripcional de un promotor *CYC1*, bajo el control de una secuencia activadora inducible por galactosa (*GAL1-10 UAS*). La cepa utilizada fue GRF167, que se transformaba con el plásmido conteniendo la fusión GST correspondiente.

Se inoculaban 5 mL de YNB-Ura con un 2% de rafinosa como fuente de azúcar, con el transformante indicado y se crecía hasta fase estacionaria, momento en el que se inoculaban 250-1000 mL de YNB-Ura 2% rafinosa y se crecía durante toda la noche a 30 °C y agitación.

Las células obtenidas se recogían por centrifugación (5000 rpm durante 5') y se resuspendían en 1 volumen de YNB-Ura 2% galactosa y 0,01% glucosa para inducir la expresión de la proteína. El cultivo se incubaba a 30 °C durante 4-5 horas, momento en el cual las células se recogían mediante centrifugación.

El precipitado celular se resuspendía en 5mL de PBS suplementado con 1% de Tritón (v/v) y una pastilla de inhibidores de proteasa comercial (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche). Las células resuspendidas se transferían a un tubo de centrifuga de 50 mL, donde se añadían esferas de vidrio de 0,5 mm Ø hasta alcanzar el menisco de la suspensión celular.

Para la rotura de las células, se aplicaban de 3 a 5 pulsos de 1' de agitación fuerte en el vórtex, seguidos de 1' de reposo en hielo, para evitar el excesivo calentamiento de la muestra. Tras el procedimiento de rotura, se añadían 10 mL de PBS + 1% Tritón (v/v), y tras mezclar fuertemente en el vórtex, se separaba el lisado de los restos celulares mediante centrifugación (10' a 3000 rpm 4 °C).

El sobrenadante recuperado se ponía en contacto con 100-150 µL de resina de glutatión-sefarosa (Glutathion-Sefarose 4B, GE Healthcare) y se incubaba durante 45'-2 horas a 4 °C y agitación leve. Tras la incubación, se permitía la sedimentación de la resina y se eliminaba el lisado celular, pasando la resina a una columna de cromatografía comercial (Bio-Spin®, Bio-Rad). Una vez empaquetada la matriz, se procedía a lavarla con al menos 5 mL de PBS.

Al finalizar el lavado, recogíamos el eluato y medíamos su concentración mediante espectrofotometría (utilizando un equipo NanoDrop® ND-1000), si la medida obtenida era inferior a 0,01 mg/µL, se recogía la matriz en 2 volúmenes de PBS + 10% de glicerol (v/v) y se conservaba a -80 °C. Para comprobar la concentración y pureza de nuestra proteína, se realizaba una SDS-PAGE con la misma.

#### Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE).

Para la polimerización del gel y separación de proteínas se siguieron los protocolos descritos por (304). Las cubetas de electroforesis usadas eran Mighty Small SE 250 de GE Healthcare.

Las muestras se diluían en tampón Laemmli 1x y previamente a su carga en el gel, se hervían durante 3 minutos. La electroforesis se realizaba sumergiendo el gel

completamente en Tampón de Electroforesis y aplicando una intensidad constante de 20 mA/gel durante 45' – 1 hora (o hasta que el frente de azul de Bromofenol alcanzara el extremo del gel).

#### *Geles de electroforesis*

	Gel de resolución 10% (10mL)	Gel de apilamiento 5% (6mL)
Agua Milli-Q	4 mL	4,1 mL
30% bisacrilamida/acrilamida	3,3 mL	1 mL
Tris 1,5 M pH 8,8	2,5 mL	-
Tris 1M pH 6,8	-	0,75 mL
SDS 10%	0,1 mL	0,06 mL
APS 10%	0,1 mL	0,06 mL
TEMED	0,004 mL	0,006 mL

#### *Tampón de electroforesis*

Tris base	250 mM
Glicina	1,94 M
SDS	1% (p/v)

#### *Tampón Laemmli 4X*

Tris-HCl pH 6,8	250 mM
SDS	4% (p/v)
B-mercaptoetanol	10% (v/v)
Glicerol	40% (v/v)
Azul de bromofenol	100 µg/mL

### *Tinción de geles de proteínas.*

Para detectar las proteínas separadas en el gel de electroforesis, se tenían los mismos con azul de Coomassie. Para ello, después de la resolución del gel, se sumergía durante 30 minutos en la solución de azul de Coomassie. Posteriormente se incubaba en una solución de desteñido hasta que desaparecía el fondo azul y las proteínas adquirían nitidez.

	Azul de Coomassie	Solución de Desteñido
Ácido acético glacial	50% (v/v)	10% (v/v)
Metanol	10% (v/v)	10% (v/v)
<i>Coomassie brilliant blue</i> R-250	0,25% (p/v)	-

Para su preservación, o para el uso posterior en otras aplicaciones, algunos geles se secaban utilizando el kit comercial DryEase® Mini-Gel Drying System (Invitrogen).

### *Ensayo de fosforilación *in vitro* de proteínas.*

Todas las proteínas incluidas en los distintos ensayos de fosforilación se trataban de fusiones GST purificadas desde *E. coli* o *S. cerevisiae*. La procedencia y naturaleza de cada sustrato y quinasa se especifica en cada experimento. Como sustrato genérico de fosforilación por MPKs se usó histona de tipo-III de timo de ternera (Sigma H5505).

Para cada reacción de fosforilación se mezclaban aproximadamente 100 ng de quinasa con la cantidad indicada de sustrato y tampón de fosforilación (Tris-HCl pH 8,5 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM, DTT 1 mM), la reacción se iniciaba con la adición de ATP 0,2 mM con 1 µCi de [γ-32P]ATP en un volumen final de 30 µL.

La mezcla de reacción se incubaba durante 30' a 30 °C, tras lo cual se detenía añadiendo 10 µL de tampón de Laemmli 4X. Todas las reacciones se calentaban a 95 °C durante 1', y se cargaban 10 µL de solución en un gel de SDS-PAGE.

Tras la resolución del gel, se procedía a su tinción y secado, tras lo cual se autoradiografiaba durante un tiempo variable, dependiendo de la reacción, en una película radiográfica comercial.

#### Defosforilación *in vitro* de proteínas.

Para la defosforilación de residuos de serina de proteínas purificadas, se empleó la fosfatasa alcalina de intestino de ternero (CIP, Roche).

Se mezclaban 100 ng de proteína purificada con 10 U de CIP en el buffer recomendado por el fabricante y se incubaba a 37 °C durante una hora con agitación leve. La reacción se detenía mediante la adición de EDTA a 50 mM.

#### BiFC

La técnica de complementación bimolecular fluorescente (BiFC) permite la detección *in vivo* de interacciones proteína-proteína. El organismo transformado se complementa con dos fragmentos no fluorescentes de una proteína fluorescente (YFP), fusionados a los dos interactores proteicos de interés, lo que permite detectar la proteína fluorescente completa restituida, cuando las dos proteínas estudiadas interaccionan (310).



## Vectores.

Los vectores utilizados en este estudio son los descritos por (307) y sus versiones para expresión en levadura y sus especificaciones se encuentran detalladas en el Anexo 3.

## Infiltración de *Agrobacterium* en hojas de *N. benthamiana*.

En este estudio se utilizó para infiltrar *Nicotiana benthamiana* la estirpe de *Agrobacterium* GV3101, que se transformó con las diferentes construcciones utilizadas como se describe en la sección correspondiente.

Los transformantes de GV3101 se infiltraron junto a la cepa p19 en plantas de 5 semanas de *N. benthamiana* tal como se describe en la M2.4.1

## Microscopía BiFC en *N. benthamiana*.

Para los procedimientos de microscopía se siguieron las instrucciones descritas en (307).

Se tomaban cortes planos de hojas tratadas, 3 días después de la infiltración y se tomaban imágenes en un microscopio confocal FluoView FV1000 (Olympus), utilizando el láser de 515-nm y el objetivo de 60X. El análisis de las imágenes se realizó con el software Olympus FluoView 2.2 (Olympus).

### Transformación de *S. cerevisiae*.

Para la determinación de interacciones en la levadura, se realizaron dos transformaciones consecutivas con cada uno de los plásmidos utilizados siguiendo el procedimiento indicado en el apartado *Transformación de levaduras*.

### Microscopía BiFC en *S. cerevisiae*.

Para la observación de las interacciones en levaduras se tomaban cultivos de los transformantes crecidos en medio selectivo YNB durante toda la noche a 30 °C y agitación suave, se centrifugaban y lavaba el medio con agua milli-Q esterilizada y se colocaban en el portaobjetos 50 µL de la suspensión celular.

Para la observación y toma de fotografías de las levaduras, se utilizó un microscopio de fluorescencia Leica DMI6000B con una cámara Hamamatsu Orca C4742-80-12AG (Hamamatsu Photonics), este equipo se operaba con el programa Openlab 5.0.2 (Improvision). Las imágenes se tomaron utilizando el filtro YFP. Alternativamente se utilizó un microscopio confocal FluoView FV1000 (Olympus), utilizando el láser de 515-nm y el objetivo de 60X. El análisis de las imágenes se realizó con el software Olympus FluoView 2.2 (Olympus).

### Análisis estadísticos.

Para los análisis estadísticos se utilizó el programa IBM SPSS 19 (IBM, Armonk, Nueva York, EE. UU.)

## Herramientas bioinformáticas.

Para el tratamiento de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas se han utilizado las diferentes herramientas del paquete DNA Star (DNASTAR, Inc. Madison, WI, EE.UU.). Para el alineamiento de secuencias de proteínas se utilizó el programa CLUSTAL-Omega (311).

Se utilizaron los recursos web encontrados en diferentes páginas web: NCBI (312), TAIR (313), UniProt (314) o T-DNA Express (315).



## Resultados

### Activación de SOS1 por MAPKs

Los estudios previos acerca del control de la activación del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  SOS1 han demostrado que un elemento regulatorio fundamental es la interacción de SOS1 con el complejo proteín quinasa SOS2/SOS3 (CIPK24/CBL4) (231, 273). Un aumento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático desembocaría en la unión del catión a SOS3 modificando su conformación, lo que le permite interaccionar con SOS2 favoreciendo su activación y reclutamiento a la membrana plasmática. Una vez allí, se formaría un complejo SOS1-SOS2-SOS3 y SOS2 fosforila el C-terminal de SOS1, lo que modifica la conformación del antiportador mediante la apertura del dominio autoinhibidor presente en el extremo C-terminal de SOS1, induciendo el intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (222, 322).

El análisis molecular de este mecanismo de activación permitió determinar que el residuo de SOS1 fosforilado por SOS2 es la serina 1138. La sustitución de este aminoácido por una alanina (no fosforilable) impedía la fosforilación de SOS1 por SOS2 en un ensayo *in vitro* (222). Adicionalmente, se observó que la transformación del mutante *sos1-1* con el alelo S1138A de SOS1 era incapaz de complementar el fenotipo de sensibilidad a sal debido a que la proteína producida no podía ser activada por el complejo SOS2/SOS3 (222).

La identificación del aminoácido diana de la quinasa SOS2 permitió también detectar la presencia de otro residuo fundamental para la activación de SOS1, la serina 1136, situada dos aminoácidos antes que el sitio de fosforilación de SOS2. Los mutantes de SOS1 en este residuo presentaban un comportamiento similar al del sitio 1138: el cambio de este residuo por una alanina impedía la fosforilación de SOS1 por SOS2 *in vitro* y reducía drásticamente la actividad de SOS1 *in vivo* (220).

El alineamiento Clustal-W de las distintas secuencias C-terminales de SOS1 permite observar que el residuo serina 1136 se encuentra conservado en la totalidad de las secuencias homólogas a SOS1 en otras especies vegetales de las que existen registros de su secuencia. Además, la posición relativa entre este residuo y el lugar de fosforilación de SOS2, la serina 1138, también se encuentra conservada en la mayoría de organismos, formando el motivo DSPS, con la única excepción de la secuencia de tomate en la que el motivo DSPS aparece interrumpido por dos aminoácidos (**Figura 6A**, (220)).

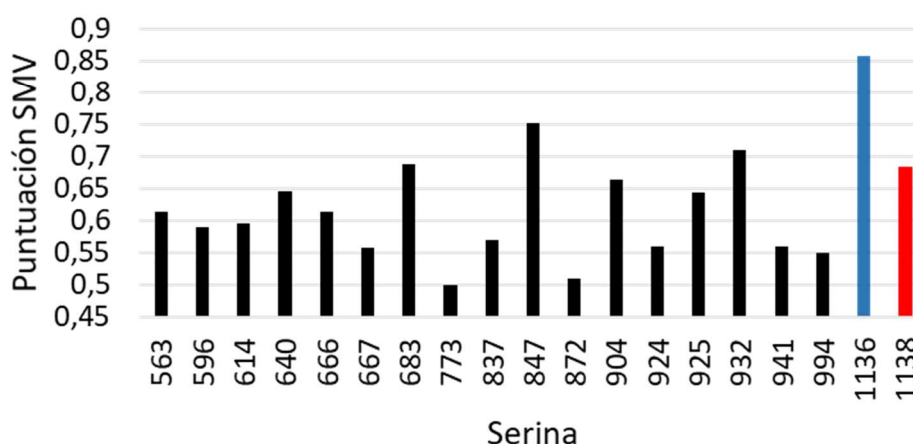
El motivo (<sub>1135</sub>X-S-P<sub>1137</sub>) en el que se encuentra la serina 1136 conforma un lugar canónico de fosforilación por quinasas del tipo MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*). La búsqueda de dianas de fosforilación por MAP quinasas utilizando el algoritmo de predicción KINESOPHOS 2.0 muestra que la serina 1136 tiene la puntuación más alta en la predicción como posible diana de quinasas de este tipo de todo el dominio citoplasmático de SOS1 (**Figura 6B**).

Ante estos indicios cabía preguntarse qué papel tiene una posible fosforilación del sitio serina 1136 sobre la actividad de SOS1 *in vivo* y si esta modificación tiene alguna relevancia sobre la actividad del antiportador, o si su papel es una modificación sobre el sitio de reconocimiento e interacción de SOS2. Igualmente parecía relevante preguntarse si son las MAP quinasas las encargadas de fosforilar el sitio serina 1136 y cómo se regula esta posible interacción.

# A

<i>Arabidopsis thaliana</i>	1128	EGIVVRIDS--PSKIVFRNDL	1146
<i>Thellungiella salsuginea</i>	1128	EGIIVRIDS--PSTIVFRNDL	1146
<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	1133	EDVIVRIDS--PSRLSF-RHAP	1151
<i>Triticum aestivum</i>	1118	EEVIVRVDS--PSMLSFNLPVPPRG	1142
<i>Oryza sativa</i>	1125	EEVIVRVDS--PSMLTFRQPSSAADR	1148
<i>Cymodocea nodosa</i>	1131	EEIIVRIDS--PSHIDI	1145
<i>Physcomitrella patens</i>	1133	EEHIVRIDS--PSFLFHNSRREL	1153
<i>Brassica napus</i>	1133	EGIIVRIDS--PSTIVSGMIEFNH	1142
<i>Chenopodium quinoa</i>	1131	EDVIVRIDS--PSGLTF-RQAP	1151
<i>Populus euphratica</i>	1139	DELIVRIDS--PRTLSFHAS	1145
<i>Solanum lycopersicum</i>	1126	DEHLIRIDSGRPSFPQWIAEEDKTS	1151
<i>Brachypodium sylvaticum</i>	1121	EGIVVRIDS--PSKIVFRNDL	1140
<i>Sorghum bicolor</i>	1111	DDVIVRIDS--PSNLTF-RQAP	1159
<i>Vitis vinifera</i>	1135	DELLVRIDS--PSKLSFHQAP	1141
<i>Zygophyllum xanthoxylum</i>	1138	EDNIVRIDS--PSGLSFR	1153

# B



**Fig. 6 Análisis in silico de la serina 1136 de SOS1.** (A) Un apilamiento Clustal-W de distintos homólogos de SOS1 muestra que el residuo de serina 1136 del extremo C-terminal de SOS1 y su secuencia contextual se encuentran fuertemente conservados entre todos los organismos con una secuencia de SOS1 conocida. La posición relativa entre la primera y la segunda serina del dominio de activación DSPS se encuentra también fuertemente conservada. (B) La búsqueda de dianas de MAP quinasas en la secuencia de SOS1 mediante la herramienta de predicción KINESOPHOS 2.0 muestra que el sitio 1136 presenta la puntuación más elevada de todo el dominio carboxiterminal de SOS1.

## Fosforilación in vitro del C-terminal de SOS1

### *Clonación y purificación de quinasas y sustratos.*

Para determinar si el aminoácido serina 1136 del extremo carboxiterminal de SOS1 puede ser fosforilado por quinasas de tipo MAPK y el papel de esta fosforilación en su interacción con SOS2, se procedieron a realizar ensayos de fosforilación *in vitro* de la región C-terminal de SOS1.

Se probaron todas las posibles combinaciones de mutaciones sustitutivas del sitio <sup>1135</sup>DSPS<sup>1138</sup>, utilizando como sustrato de la reacción fusiones GST del extremo C-terminal de SOS1 desde los aminoácidos 998 ó 1129 hasta el final de la proteína, a los que se les había sustituido, mediante PCR dirigida, las serinas 1136 y 1138 por alanina (aminoácido no fosforilable) o aspartato (aminoácido cargado negativamente que produce una mimesis estructural de la presencia de un grupo fosfato) (318, 319). Todas las versiones recombinantes del péptido fueron clonadas en el vector de expresión pGEX-4T1, expresadas en *E. coli* y purificadas por cromatografía de afinidad (Tabla 1).

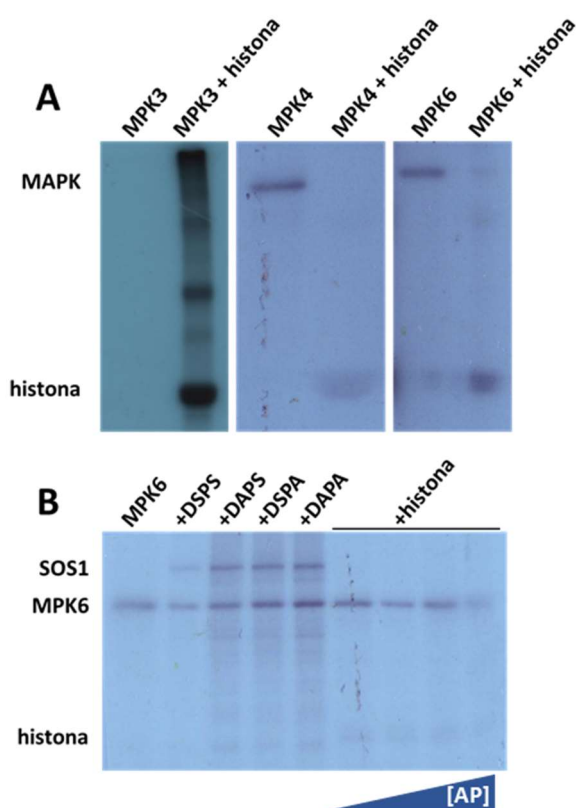
<b>WT</b>	silvestre	<sup>1129</sup> GIVVRID <sup>SP</sup> SKIVFRNDL <sup>1146</sup>	Silvestre
<b>DAPS</b>	no fosforilable	<sup>1129</sup> GIVVRID <sup>AP</sup> SKIVFRNDL <sup>1146</sup>	Ser-1136 a Ala.
<b>DSPA</b>	no fosforilable	<sup>1129</sup> GIVVRID <sup>SP</sup> AKIVFRNDL <sup>1146</sup>	Ser-1138 a Ala.
<b>DAPA</b>	no fosforilable	<sup>1129</sup> GIVVRID <sup>AP</sup> AKIVFRNDL <sup>1146</sup>	Ser-1136 y Ser-1138 a Ala.
<b>DDPS</b>	fosfomimético	<sup>1129</sup> GIVVRID <sup>DP</sup> SKIVFRNDL <sup>1146</sup>	Ser-1136 a Asp.
<b>DSPD</b>	fosfomimético	<sup>1129</sup> GIVVRID <sup>SP</sup> DKIVFRNDL <sup>1146</sup>	Ser-1138 a Asp.
<b>DDPD</b>	fosfomimético	<sup>1129</sup> GIVVRID <sup>DP</sup> DKIVFRNDL <sup>1147</sup>	Ser-1136 y Ser-1138 a Asp.

**Tabla. 1. Versiones mutantes del C-terminal de SOS1 utilizados en esta tesis.**



De modo similar, los cDNAs de las quinasas *MPK3*, *MPK4* y *MPK6* se clonaron en el vector pGEX-4T1 y se expresaron desde *E. coli*, purificando la proteína resultante por cromatografía de afinidad.

Se pudo observar, mediante un ensayo de actividad quinasa utilizando histonas como sustrato genérico de MAPKs, que las distintas MAP quinasas poseían diferente actividad *in vitro*. *MPK6* y *MPK4* presentaban una actividad muy baja al ser expresadas y purificadas desde *E. coli*. *MPK3*, sin embargo, sí presentaba una fuerte actividad quinasa al ser purificada desde el procariota (**Figura 7A**).



**Fig. 7 Actividad quinasa *in vitro* de MPK6, MPK3 y MPK4.** (A) Fusiones a GST de MPK6, MPK3 y MPK4 fueron expresadas en *E. coli* y purificadas por cromatografía de afinidad. La proteína obtenida se incubó con histonas como sustrato genérico de fosforilación. Se resolvieron alícuotas de la reacción mediante SDS-PAGE y se autoradiografió el gel. La imagen muestra una placa de autoradiografía expuesta durante 1 hora (MPK3) ó 12 horas (MPK4 y MPK6). (B) Actividad quinasa de MPK6 purificada de *S. cerevisiae* y efecto de ácido fosfatídico sobre su actividad. Para purificar MPK6 expresada en levaduras se subclonó su cDNA en el vector pEG(KT) para la expresión de una fusión GST:MPK6 en *S. cerevisiae*. Se realizaron ensayos de fosforilación utilizando como sustrato fusiones GST del fragmento carboxiterminal 998-1146 de SOS1 silvestre (DSPS), y los mutantes S1136A (DAPS), S1138A (DSPA) y S1136A/S1138A (DAPA). Para determinar si la adición de ácido fosfatídico (AP) producía un efecto positivo sobre la actividad de MPK6 se añadieron a la reacción de fosforilación concentraciones

crecientes del reactivo (0, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 40  $\mu$ M), utilizando para este ensayo histonas como sustrato genérico. La imagen muestra una placa de autoradiografía expuesta durante 12h dónde se puede observar que la quinasa se encuentra inactiva en todas las situaciones.

Para comprobar si la baja actividad de MPK6 se debía a la necesidad de modificaciones post-traduccionales, se procedió a subclonar el cDNA de *MPK6* en el vector pEG(KT) para la expresión de fusiones GST en la levadura *S. cerevisiae*. En este caso observamos igualmente que la proteína MPK6 purificada presentaba una débil autofosforilación y no poseía actividad quinasa apreciable sobre el sustrato de histona (**Figura 7B**). Sí se observó una fosforilación basal del fragmento de SOS1 usado como sustrato, que no pudo ser atribuída a la Ser-1136 puesto que también se detectó la fosforilación de las versiones mutantes DAPS y DAPA. Como se discutirá más adelante esta fosforilación de fondo podría ser debida a MPKs endógenas de la levadura, que podrían co-purificar con el fragmento C-terminal de SOS1 extraído de la levadura.

En el trabajo publicado por Yu et al. (2010) (141) se había descrito un efecto positivo del ácido fosfatídico (AP) en la actividad de MPK6, por lo que se repitieron los ensayos de actividad suplementando la reacción de fosforilación con concentraciones crecientes de AP (de 5 a 40  $\mu$ M), no obteniendo actividad apreciable sobre un sustrato genérico de histona ni sobre el C-terminal de SOS1, utilizando en ambos casos MPK6 purificada desde *S. cerevisiae* (**Figura 7B**).

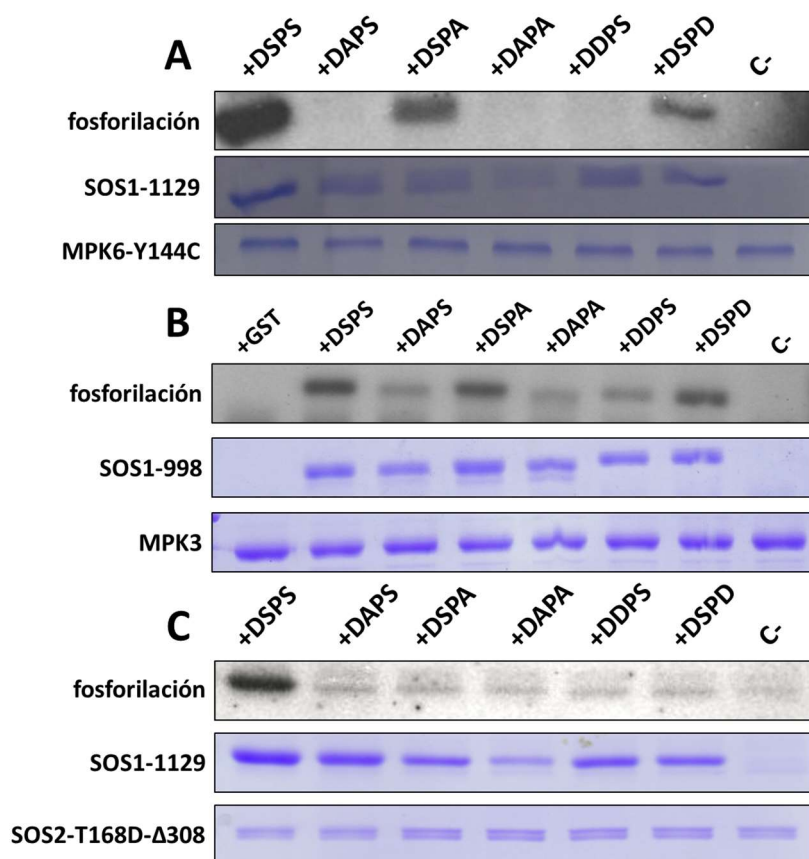
En el artículo de Berriri et al., (2012) (153) se describían dos versiones de MPK6 constitutivamente activas *in vitro* y capaces de complementar el mutante de levadura  $\Delta pbs1 \Delta hog1$ . PBS1 y HOG1 son MAPKs de *S. cerevisiae* implicadas en la respuesta al estrés osmótico y salino. El mutante  $\Delta hog1$  puede ser complementado por el par MPK6–MKK2 (siendo MKK2 la quinasa activadora de MPK6), o por versiones constitutivamente activas de MPK6 y MPK4 (153, 178, 320). Basándonos en estas observaciones se produjeron las versiones mutantes MPK6-Y144C (sustitución de la tirosina 144 por una cisteína) y MPK6-D218G/E222A (una doble sustitución del aspártico 218 a glicina y del glutámico 222 a alanina). Para ello sustituimos mediante mutagénesis dirigida por PCR los residuos indicados y subclonamos los cDNAs mutantes resultantes en el vector pGEX-4T1. Las proteínas fueron expresadas en *E. coli*

y purificadas por cromatografía de afinidad. Los posteriores ensayos *in vitro* realizados con estos mutantes hiperactivos de MPK6, mostraron que poseían una actividad quinasa constitutivamente superior a la de MPK6 silvestre frente a SOS1 (**Figura 8** y resultados no mostrados).

#### *Fosforilación del extremo carboxilo terminal de SOS1 por MPK6, MPK3 y SOS2.*

Una vez obtenidas todas las proteínas recombinantes del fragmento 1129-1146 de SOS1 con el motivo DAPS mutado, se repitieron los ensayos de fosforilación por MPKs, incubando durante 30 minutos los péptidos de SOS1 con MPK6-Y144C y MPK3 silvestre. Los ensayos mostraron que la versión hiperactiva de MPK6 era capaz de fosforilar el extremo C-terminal de SOS1 y que la modificación de la serina 1136 a un aminoácido no fosforilable o fosfomimético impedía la fosforilación del péptido SOS1-1129 por parte de la quinasa. Adicionalmente, esta reacción no se veía afectada por la composición del sitio 1138, siendo capaz de realizar la reacción de fosforilación sea el sitio 1138 una serina, una alanina o un aspártico. Podemos concluir por tanto que MPK6 fosforila a SOS1 específicamente en el residuo 1136 sin verse afectada esta reacción por el estado de fosforilación del sitio 1138 (**Figura 8A**).

De manera similar, se realizó el ensayo de fosforilación del C-terminal de SOS1 con la fusión GST-MPK3 purificada desde *E. coli*. En este caso, observamos un comportamiento similar al de su quinasa homóloga MPK6-Y114C. MPK3 fue capaz de reconocer específicamente el sitio 1136 independientemente de la naturaleza del residuo 1138. Además, cualquier sustitución de la serina 1136 previene la reacción de fosforilación (**Figura 8B**). La débil fosforilación que se observa frente a los sustratos DAPS, DAPA y DDPS probablemente refleja una fosforilación espúrea en otros sitios diferentes a Ser-1136 debido a la gran actividad quinasa de MPK3 *in vitro*.



**Fig. 8 Fosforilación *in vitro* de los mutantes en el sitio DSPS de SOS1 por MPK6. (A)** Fusiones GST de los fragmentos 1129-1146 (SOS1-1129) de SOS1 silvestre (DSPS), y los mutantes S1136A (DAPS), S1138A (DSPA), S1136A/S1138A (DAPA), S1136D (DDPS), S1138D (DSPD) y S1136D/S1138D (DDPD) se incubaron con una versión constitutivamente activa de MPK6-Y144C. C- indica control negativo sin sustrato **(B)** Fusiones GST de los fragmentos 998-1146 (SOS1-998) de SOS1 se incubaron con la MAP quinasa MPK3. **(C)** Fusiones GST de los fragmentos SOS1-1129 se incubaron con la versión constitutivamente activa de SOS2 (SOS2-T168D-Δ308). En las imágenes se muestra la autoradiografía (actividad) y la tinción con Azul Coomassie de las proteínas SOS1 y la quinasa ensayada.

Para ensayar la fosforilación por SOS2, purificamos una fusión GST del alelo hiperactivo SOS2-T168D-Δ308, con la treonina 168 sustituida por un aspartato y una delección del C-terminal desde el aminoácido 308, lo que elimina su dominio autoinhibidor. Esta versión de la proteína ya había sido descrita previamente como hiperactiva tanto *in vitro* como *in vivo* (216).

Al ensayar la actividad quinasa de SOS2-T168D-Δ308 sobre el C-terminal de SOS1 se observó que SOS2 únicamente es capaz de fosforilar el péptido de SOS1 cuando este presenta un dominio de reconocimiento silvestre DSPS (**Figura 8C**). Como

cabría esperar, la fosforilación de SOS1 por SOS2 se impide por la mutación del sitio serina 1138 a residuos no fosforilables o fosfomiméticos, además de por cualquier modificación del residuo serina 1136. Un resultado similar a éste se había observado previamente para el mutante DAPS (220). La modificación de la serina 1136 por una alanina eliminaba la fosforilación del sitio 1138 por parte de SOS2 *in vitro*, además de impedir la activación de SOS1 *in vivo*, tanto en levadura como en planta.

En nuestro caso, observamos además que la presencia de un aspártico en lugar de la serina 1136 (DDPS) también suprime la actividad quinasa de SOS2 *in vitro*. Cabe destacar que los experimentos previos (220) se realizaron sobre un péptido carboxiterminal de SOS1 purificado desde levadura, por lo que éste podría encontrarse fosforilado en el sitio 1136 por parte de las MAP quinasas endógenas de la levadura (ver Sección *Efecto de las quinasas endógenas de levadura sobre la actividad de SOS1 y MPK6*). Esto último sugería que la presencia de un grupo fosfato en el sitio serina 1136 no debería entorpecer el reconocimiento de SOS1 por parte de SOS2. No está clara por tanto la causa por la que SOS2 no puede fosforilar a SOS1 *in vitro* al sustituir la serina 1136 por un ácido aspártico. Existen ejemplos en la bibliografía en los que un aspártico no consigue mimetizar una fosforilación de una serina (319). Otra posibilidad es que la fosforilación del péptido de SOS1 purificado desde levadura por parte de quinasas endógenas no sea total (en el punto 1.4 se muestra cómo se purifican de levaduras dos poblaciones muy definidas de péptido fosforilado y sin fosforilar) y que la inhibición de la fosforilación del sitio serina 1138 mediado por una fosforilación del sitio serina 1136 sea un mecanismo de regulación de la actividad del antiportador, aunque esta hipótesis no es consistente con otros resultados obtenidos en este trabajo.

#### *Caracterización funcional de los mutantes DAPS y la interacción SOS – MAPK.*

##### *Actividad en levaduras de mutantes de SOS1 en el motivo DAPS.*

Una vez determinada la especificidad de cada quinasa en las fosforilaciones del sitio DAPS de SOS1, queríamos determinar qué efecto regulador tenía cada una de las

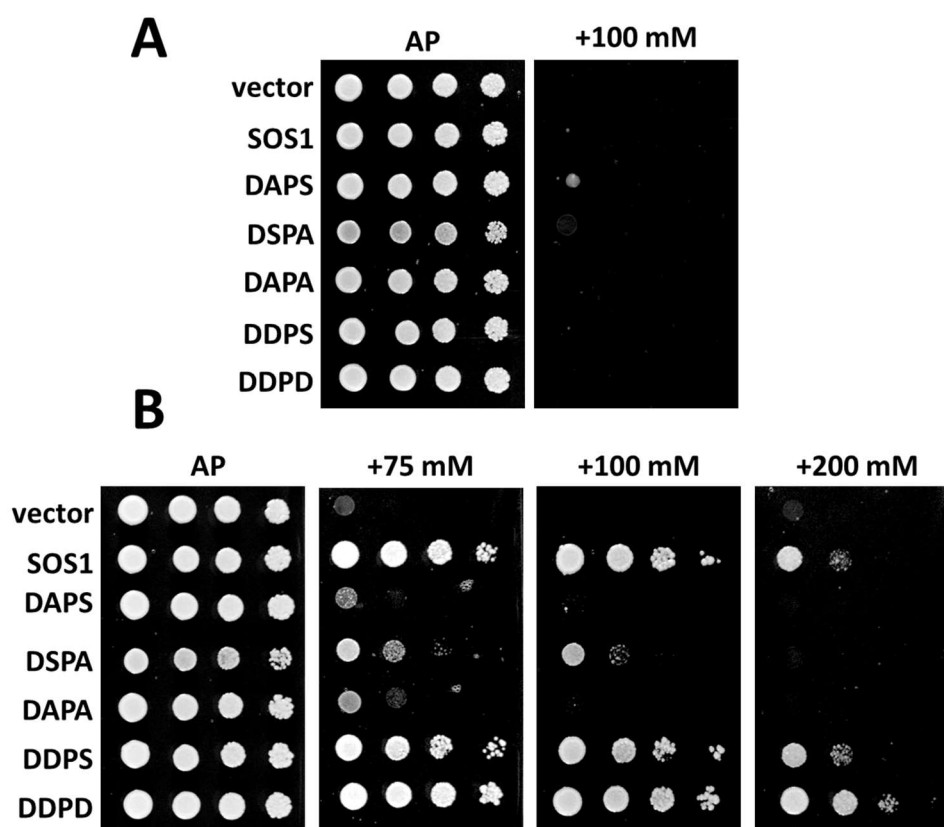
modificaciones sobre la actividad del antiportador y que relación, si existe, poseen estas dos modificaciones entre sí.

Para determinar el efecto en la actividad de SOS1 del estado de fosforilación de los residuos de serina 1136 y 1138, se analizó el efecto de la mutación de los mismos en la actividad de SOS1 expresado en *S. cerevisiae*. Para ello, se utilizaron las estirpes AXT3K ( $\Delta ena1-4 \Delta nhx1 \Delta nha1$ ) y JP837 ( $\Delta ena1-4 \Delta nhx1 \Delta nha1 PGK1::AtSOS1::CYC1$ ). A estas estirpes de levaduras se les han eliminado los principales efectores de tolerancia a la salinidad (las bombas de sodio ENA1 a 4, el antiportador  $K^+, Na^+/H^+$  endosomal NHX1 y el antiportador  $K^+, Na^+/H^+$  de membrana plasmática NHA1) lo que propicia un fenotipo de extrema sensibilidad a la presencia de sodio en el medio debido a la incapacidad de la levadura para expulsarlo al exterior celular o almacenarlo en la vacuola. JP837 es la cepa resultante de la inserción cromosómica del cDNA de SOS1 en la cepa AXT3K, lo que proporciona una expresión moderada y constitutiva de SOS1 en el mismo fondo genético. Experimentos previos han demostrado que estas estirpes pueden complementarse por la reconstitución del sistema SOS de *Arabidopsis* (273), ya que la extrusión de sodio por parte de SOS1 restituye la tolerancia al sodio de la levadura, siendo un modelo óptimo para determinar la actividad de las proteínas del sistema SOS.

La transformación de la cepa AXT3K con SOS1 supone un leve aumento del crecimiento en presencia de sal con respecto al mutante debido a la actividad basal del antiportador. Su co-expresión con SOS2 resulta en un incremento de la actividad de SOS1, aumentando el rango de salinidad tolerado por la levadura. La co-expresión de SOS1 junto con SOS2 y SOS3 produce una mayor actividad antiportadora, permitiendo un crecimiento de la levadura a concentraciones salinas superiores. En el caso de utilizar la versión hiperactiva de SOS2 (SOS2-T168D- $\Delta$ 308) la actividad de SOS1 permite un estado de crecimiento intermedio entre la complementación con SOS2 silvestre y con el sistema completo SOS2/SOS3 (273).

Para comprobar el efecto sobre la actividad de SOS1 de las mutaciones en los sitios de fosforilación serina 1136 y serina 1138, se expresaron en la levadura las proteínas del sistema SOS, utilizando las diferentes versiones mutantes del sitio DSPS

de SOS1. Para ello se transformó la cepa AXT3K con el vector pYPGE15 portando la proteína SOS1 completa en su forma silvestre o los mutantes SOS1-DAPS (serina-1136 sustituida por alanina), SOS1-DSPA (serina-1138 sustituida a alanina), SOS1-DAPA (serina-1136 y serina 1138 a alanina), SOS1-DDPS (serina-1136 a aspártico) y SOS1-DDPD (serina-1136 y serina-1138 a aspártico). Los clones obtenidos se co-transformaron con la forma hiperactiva SOS2-T168D- $\Delta$ 308 en el vector p414GPD. Los distintos transformantes resultantes se crecieron durante la noche en medio mínimo YNB hasta saturación y se sembraron diluciones seriadas en medio sintético AP suplementado con 1 mM de KCl y concentraciones crecientes de NaCl (**Figuras 9A y B**)



**Fig. 9 Caracterización funcional de los mutantes SOS1 en el sitio DAPS en presencia de SOS2-T168D- $\Delta$ 308.** Se realizaron ensayos de crecimiento de la cepa de levadura AXT3K transformada con el antiportador SOS1 silvestre (SOS1), SOS1-S1136A (DAPS), SOS1-S1138A (DAPS), SOS1-S1136A/S1138A (DAPA), S1136D (DDPS) y S1136D/S1138D (DDPD) en ausencia de SOS2 (**A**), o en co-expresión con la quinasa hiperactiva SOS2-T168D- $\Delta$ 308 (**B**). El medio sintético AP se suplementó con 1 mM de KCl y la concentración de NaCl indicada. Los distintos alelos de SOS1 se clonaron en el vector pYPGE15 y la quinasa SOS2-T168D- $\Delta$ 308 en el vector p414GPD.

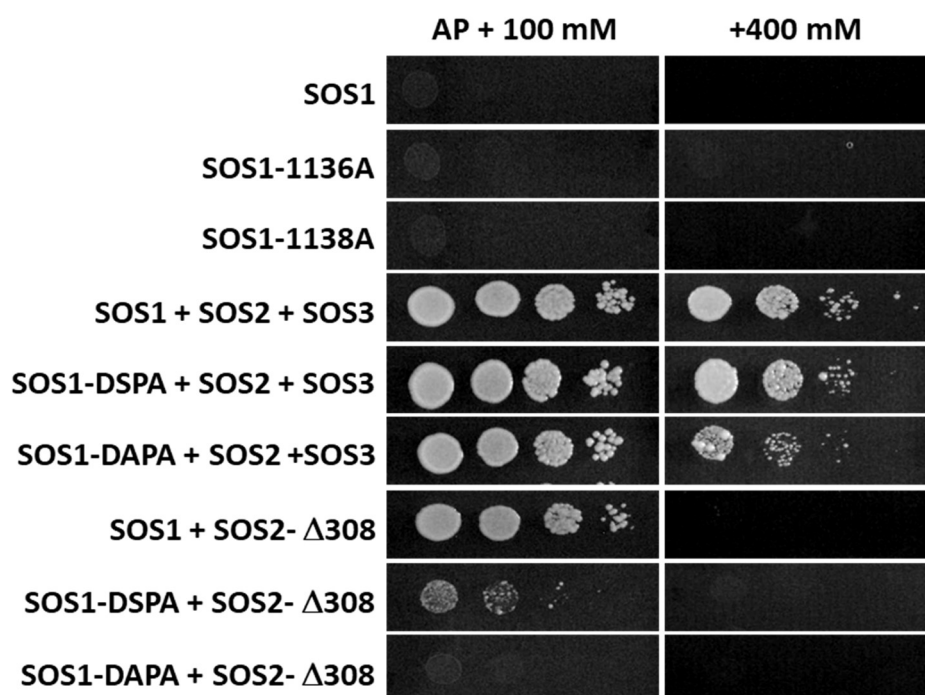
Observamos que ninguna modificación del sitio DSPS modificó la actividad basal de SOS1 (**Figura 9A**). La presencia de un aminoácido fosfomimético en los sitios serina 1136 o serina 1138 no aumentó el nivel basal de actividad de SOS1, lo que apunta a que el evento de fosforilación no es suficiente para estimular la actividad de SOS1 y sería necesaria la interacción SOS1-SOS2. De hecho, la co-expresión del alelo hiperactivo de SOS2 (SOS2-T168D-Δ308) nos permitió observar diferencias entre los distintos mutantes de SOS1 (**Figura 9B**). La sustitución individual o conjunta de los residuos de serina a aminoácidos no fosforilables (mutaciones DAPS, DSPA y DAPA) disminuyó notablemente la actividad de SOS1 en presencia de SOS2-T168D-Δ308, consecuentemente con lo observado en experimentos anteriores (**Figura 8**). Es destacable que aparentemente sea más determinante para la activación del antiportador la ausencia del residuo serina 1136 (sitio de fosforilación por MAP quinasas) que la de la serina 1138 (sitio de fosforilación del SOS2). Es posible que una modificación del sitio serina 1136 a alanina impida por completo el acceso de SOS2 a su sitio de acción o que la fosforilación del residuo serina 1136 sea necesaria para la activación completa de SOS1 por SOS2 *in vivo*.

En el caso de la sustitución de la serina 1136 por aminoácidos fosfomiméticos, la actividad de SOS1 se mantiene idéntica al alelo silvestre en el caso de la mutación DDPS y parece aumentar levemente en el caso de DDPD. Llama la atención la ausencia de efecto en el caso de DDPS, que se comporta igual que el alelo silvestre DSPS cuando se co-expresa con SOS2-T168D-Δ308. Ya hemos visto que la sustitución de la serina 1136 por un aminoácido no fosforilable posee un efecto muy marcado sobre la actividad del antiportador mientras que un aminoácido cargado negativamente en el sitio serina 1136 parece no entorpecer el reconocimiento de SOS1 por SOS2, lo que indicaría que una fosforilación en este primer aminoácido podría favorecer la interacción de SOS1 y SOS2 necesaria para la unión y fosforilación *in vivo*. En conjunto, la ausencia de diferencias en el crecimiento entre los alelos DSPS y DDPS, junto a la desaparición de la actividad SOS1 en el mutante DAPS nos llevo a pensar que la serina 1136 debía estar sufriendo una fosforilación por parte de una quinasa endógena no identificada de *S. cerevisiae* (ver sección *Efecto de las quinasas endógenas de levadura sobre la actividad de SOS1 y MPK6*).



El comportamiento de los alelos DDPD y DSPA era especialmente sorprendente según nuestro modelo de activación SOS1-SOS2. En teoría, SOS2-T168D-Δ308 funciona como una quinasa hiperactiva desregulada, lo que nos permite observar la fosforilación incondicional de SOS1. Sin embargo en la **Figura 9** podemos observar que su interacción con SOS1-DSPA y SOS1-DDPD induce la activación del antiportador, a pesar de no poder fosforilar su diana, la serina 1138. Además, en el caso de SOS1-DDPD, la actividad de SOS1 es superior a la de la versión silvestre. Esto nos indica que la presencia de fosfoserinas, ya sean naturales (DSPA) o fosfomiméticas (DDPD), posee un efecto positivo en interacción entre SOS1 y SOS2, lo que favorece la activación del antiportador.

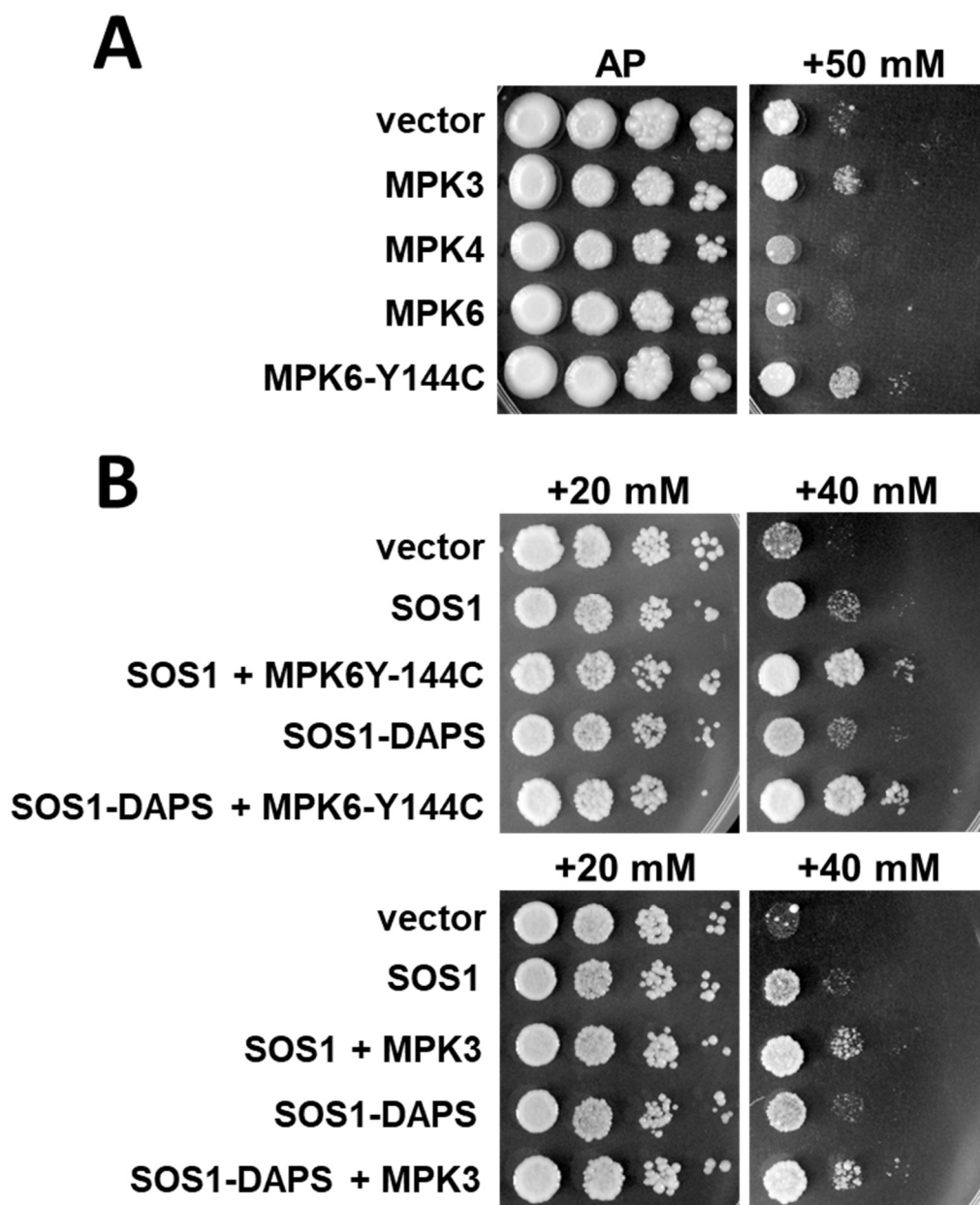
Para dilucidar el efecto de las mutaciones en el sitio DSPS en la interacción de SOS1 con SOS2 y SOS3, repetimos el ensayo de complementación funcional transformando AXT3K con el complejo proteín quinasa nativo SOS2/SOS3, acompañando a las versiones de SOS1 DSPA y DAPA (**Figura 10**). Pudimos comprobar que la interacción con el complejo SOS2/SOS3 induce un incremento de la actividad de SOS1, tanto en la forma silvestre, como en las versiones mutantes DSPA y DAPA. También observamos que si bien ambas versiones mutantes podían alcanzar actividades suficientes para tolerar hasta 400 mM de NaCl, la versión DSPA (no fosforilable por SOS2) presentaba una actividad superior, al igual que SOS1 silvestre, mientras que el mutante DAPA parecía ligeramente menos activo. Este resultado nos indica que, en la levadura, SOS3 facilita la formación de un complejo con el C-terminal de SOS1, y que este evento puede ser suficiente para la activación del antiportador, incluso en ausencia de los sitios de fosforilación nativos. Sin embargo, la fosforilación de los sitios 1136 y 1138 parece tener un efecto positivo sobre la interacción de SOS2 con SOS1, favoreciendo la unión de SOS2 en ausencia (**Figura 9**) o presencia (**Figura 10**) de SOS3.



**Fig. 10 Caracterización funcional de los mutantes SOS1 en el sitio DSPS en presencia de SOS2 y SOS3.** Se realizaron ensayos de crecimiento de la cepa de levadura AXT3K transformada con el antiportador SOS1 silvestre (SOS1), SOS1-S1138A (DSPA) y SOS1-S1136A/S1138A (DAPA), co-expresados con el complejo quinasa SOS2/SOS3 o la versión hiperactiva SOS2-T168D-Δ308. El medio sintético AP se suplementó con 1 mM de KCl y la concentración de NaCl indicada. Los distintos alelos de SOS1 se clonaron en el vector pYPGE15, la quinasa SOS2-T168D-Δ308 en el vector p414GPD y la pareja SOS2/SOS3 en el vector pFLT.

#### *Activación por MAPK de SOS1 en levaduras.*

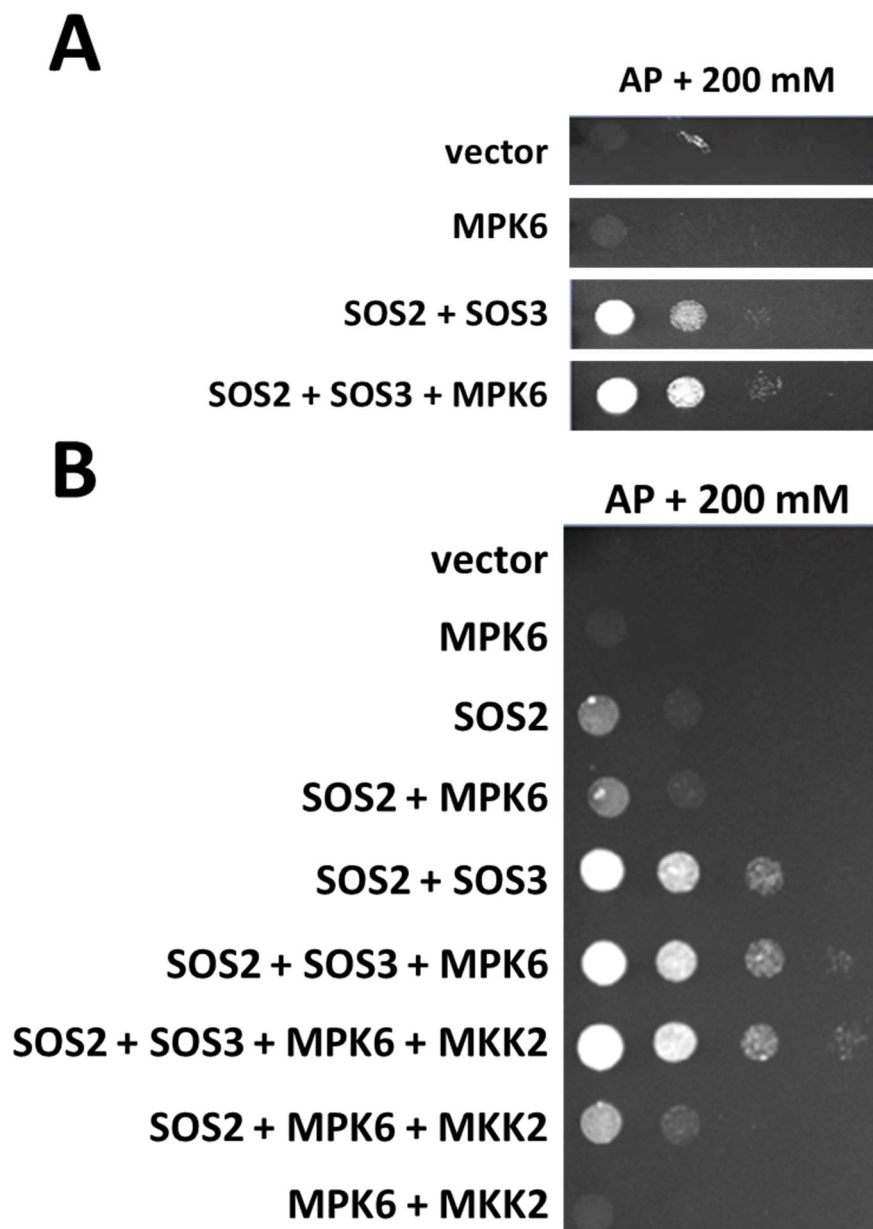
Para comprobar el posible efecto regulador de MPK3, MPK4 y MPK6 sobre la actividad de SOS1 *in vivo*, se procedió a expresarlas en la cepa JP837, que ya expresa SOS1 de manera constitutiva a partir de una inserción cromosómica de su cDNA. En el caso de MPK6 se incluyó también la versión hiperactiva MPK6-Y144C. Para ello se utilizaron cDNAs clonados en el vector de expresión en levadura pYPGE15 y se midió la tolerancia a NaCl de los transformantes obtenidos en medio sólido (**Figura 11A**). Sólo MPK3 y la versión hiperactiva MPK6-Y144C incrementaron moderadamente el crecimiento en sal de JP837, sugiriendo un efecto positivo en la actividad de SOS1 mediado por estas quinasas que se superpone a la activación por las quinasas endógenas de la levadura.



**Fig. 11 Caracterización funcional de la fosforilación de SOS1 por MPK6.** (A) Se realizaron ensayos de crecimiento de levaduras con la cepa de levadura JP837 transformada con distintas MAPK (MPK3, MPK4, MPK6 y su versión constitutivamente activa MPK6-Y144C). (B) La cepa AXT5 se transformó con SOS1 silvestre (SOS1) o su versión mutante a alanina en la serina 1136 (SOS1-DAPS); adicionalmente se expresaron MPK6-Y144C y MPK3. El medio sintético AP se suplementó con 1 mM de KCl y la concentración de NaCl indicada. Los distintos alelos de SOS1 se clonaron en el vector p425GPD y las MAPK en el vector pYPGE15.

Para comprobar que esta activación del antiportador SOS1 se producía por una fosforilación en el sitio serina 1136, se repitió el ensayo utilizando el mutante SOS1-S1136A co-expresado en la cepa AXT5 (similar a AXT3K) junto a MPK3 y MPK6-Y144C (**Figura 11B**). Sorprendentemente, la activación de SOS1 por MAPK no desaparece al eliminar la serina 1136. Este resultado podría deberse a la interacción física de MPK3 y MPK6 con el sitio de fosforilación en el dominio autoinhibor de SOS1, formando un complejo que interfiere con la autoinhibición, de manera similar a lo observado en el caso de SOS2 con el mutante SOS1-DSPA (**Figuras 9 y 10**). Al igual que SOS2, la actividad quinasa de la proteína implicada parece ser relevante en el proceso de activación por interacción proteína-proteína, pues podemos ver diferencias entre MPK6 y su versión hiperactiva Y144C (**Figura 11A**). Alternativamente, podría considerarse la existencia de sitios de fosforilación por MAPK adicionales en SOS1, relevantes para su activación por MAPKs.

El efecto en la actividad de SOS1 de las mutaciones en el sitio DSPS evidenciaban una regulación compleja del antiportador mediada por la actividad conjunta de SOS2 y las quinasas tipo MAPK. Para determinar la posible interacción funcional entre SOS2 y MPK3/6 en el proceso de activación de SOS1, se procedió a expresar en la cepa AXT3K las proteínas del sistema SOS junto con MPK6 y se midió su crecimiento en presencia de sodio. Este experimento indicó que MPK6 no tenía un efecto perceptible sobre la actividad de SOS1 en solitario ni acompañada de SOS2. En el caso de la complementación con el sistema SOS al completo se observó un efecto positivo muy leve sobre la actividad antiportadora de SOS1 cuando MPK6 acompañaba a SOS2 y SOS3 (**Figura 12A**).



**Fig. 12 Caracterización funcional del sistema SOS en presencia de MPK6 y MKK2.** (A) Se realizaron ensayos de crecimiento de levaduras con la cepa de levadura JP837 (AXT3K con una inserción en el cromosoma del cDNA de SOS1) transformada con el vector pYPGE15 vacío (vector), la MAP quinasa MPK6, el módulo SOS2 y SOS3, y la combinación de las tres proteínas SOS con MPK6. El medio sintético AP se suplementó con 1 mM de KCl y 200 mM de NaCl. MPK6 se clonó en pYPGE15, SOS2 y SOS3 en una versión modificada del vector pFLT con dos casetes de expresión. (B) Repetición del ensayo añadiendo la MAP2K MKK6. La pareja MPK6/MKK2 se clonó en una versión modificada del vector pAAR6\_con dos casetes de expresión.

Nuestras observaciones previas acerca del nulo efecto de expresar *MPK6* en *S. cerevisiae* y la descripción en (178) de la necesidad de co-expresar el par MPK6-MKK2 para complementar el mutante *hog1* de *S. cerevisiae*, indicaban un estado de baja actividad de MPK6 en el contexto metabólico de la levadura. Por ello, se co-expresó la proteína MKK2 junto a MPK6. Un ensayo de crecimiento de levaduras en NaCl mostró que no existía un efecto directo del par MPK6-MKK2 sobre SOS1, pero sí un aumento de la actividad del complejo SOS1-SOS2-SOS3 cuando MPK6 se encontraba presente. Este ligero aumento de actividad de SOS1 era idéntico en presencia o ausencia de MKK2, sugiriendo que la actividad quinasa de MPK6 no es necesaria para la ligera activación de SOS1 observada en su presencia (**Figura 12B**).

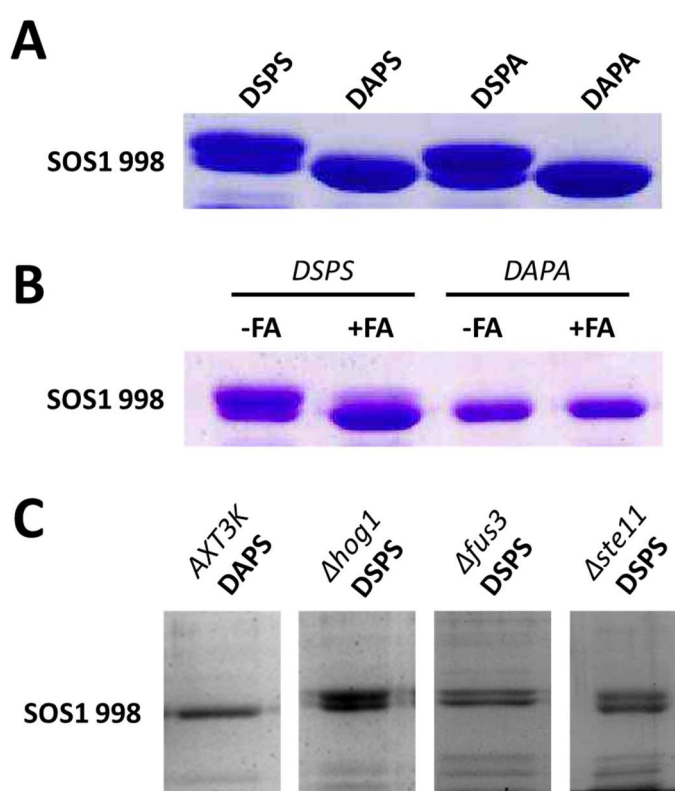
En conjunto, los resultados de la actividad del antiportador SOS1 en la levadura, parecen apuntar a un papel fundamental de la serina 1136 en el reconocimiento y fosforilación de SOS1 por SOS2. Por otro lado, MPK3 y MPK6 parecen tener un efecto positivo sobre la actividad de SOS1 que podría estar mediada en parte por la fosforilación de la serina 1136 y en parte por la interacción física con SOS1. Además, la presencia de MPK6 podría tener un efecto positivo sobre la activación de SOS1 por parte de la ruta SOS2/SOS3, aunque estos resultados son difícilmente interpretables debido a la debilidad del fenotipo obtenido. Un efecto tan leve de MPK3 y MPK6 sobre la actividad de SOS1 en la levadura resulta sorprendente tras observar el efecto tan marcado que produce en la interacción entre SOS1 y SOS2 la sustitución de la serina 1136 (**Figura 9**), lo que nos llevó a plantearnos que el efecto de las MAPK se encontraba enmascarado por alguna quinasa endógena de la levadura.

#### *Efecto de las quinasas endógenas de levadura sobre la actividad de SOS1 y MPK6.*

Recapitulando los resultados anteriores podemos hipotetizar que aunque el sitio de fosforilación de SOS2 es la serina 1138, el residuo serina 1136 es fundamental para el reconocimiento y posterior activación de SOS1 por parte de SOS2 (**Figuras 8C y 9B**). Sin embargo, la coexpresión con *SOS1* y *SOS2* nos muestra que MPK6 no es necesaria para activar a SOS1 en la levadura (**Figura 9B**), y que el posible efecto

positivo sobre la actividad de SOS1 de la coexpresión de *SOS2* y *MPK6* es muy leve y solo se aprecia a concentraciones elevadas de sal (**Figura 12**).

Adicionalmente, la purificación de fragmentos C-terminales de SOS1 desde levadura para experimentos de fosforilación *in vitro* nos permitió observar que la proteína extraída se separaba en dos poblaciones del péptido claramente diferenciadas al separarse electroforéticamente en un gel desnaturizante SDS-PAGE (**Figura 13A**). Este salto en el peso molecular aparente del péptido, que se corresponde con el de una fosforilación, desaparecía si las muestras eran tratadas previamente con fosfatasa alcalina (**Figura 13B**) lo que indica que se deben a la fosforilación de SOS1 por parte de una quinasa endógena de la levadura. De igual modo, la expresión en la levadura de versiones mutantes DAPA o DAPS del fragmento C-terminal de SOS1 producían péptidos que migraban en una sola población del peso molecular más bajo en la electroforesis (**Figura 13B**), por lo que podemos localizar este evento de fosforilación endógeno específicamente en el residuo serina 1136.



**Fig. 13 Determinación del origen de la fosforilación de S1136 por quinasas endógenas de *S. cerevisiae*.** (A) Fusiones GST del péptido carboxilo terminal de SOS1 (998-1146) expresados en levadura y purificados por cromatografía de afinidad, permiten observar un doblete en la

resolución de la proteína por SDS-PAGE. Este doblete, que supone un salto de peso molecular consistente con una fosforilación, sólo aparece cuando la serina 1136 se encuentra presente. **(B)** El tratamiento de la proteína purificada con fosfatasa alcalina hace desaparecer la población de péptido hipotéticamente fosforilada. Esta variación del peso molecular por defosforilación no se produce cuando la serina 1136 se muta a alanina. **(C)** Para determinar qué MAPK quinasa endógena era responsable de la fosforilación del residuo 1136, se purificó el péptido SOS1 (998-1146) desde diferentes cepas mutantes de levadura carentes de las MAP quinasas HOG1 y FUS3 homologas a MPK6 o su regulador aguas arriba STE11.

Para determinar qué quinasa endógena de la levadura era la responsable de la fosforilación del residuo serina 1136 y del posible enmascaramiento del fenotipo de activación por MPK6, procedimos a purificar el C-terminal de SOS1 de las cepas de levadura mutantes en *HOG1*, el homólogo más cercano en *S. cerevisiae* de las MPK3/MPK6 vegetales, de proteínas implicadas en la activación de HOG1 (STE11) o de otra MAPK activada por esta ruta (FUS3) (320).

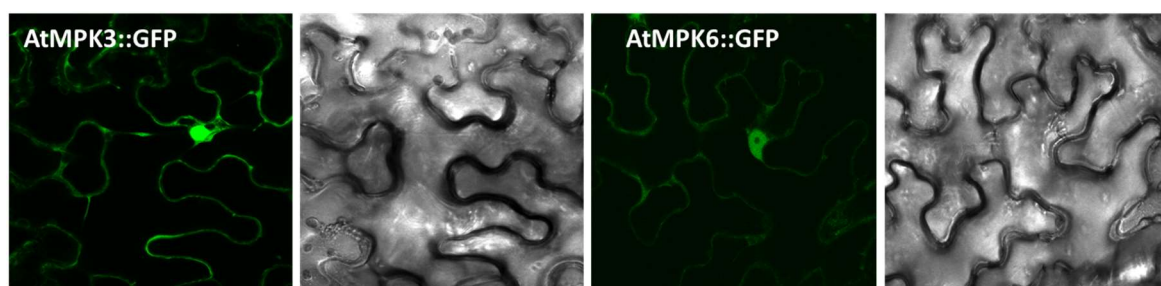
La purificación de los fragmentos desde las distintas cepas mutantes produjo, en todos los casos, péptidos parcialmente fosforilados que se distribuían en dos bandas al resolverlos por electroforesis, indicando que la fosforilación de SOS1 no es producida por ninguna de las quinasas estudiadas, o por varias de ellas de manera redundante (**Figura 13C**).

#### Interacción entre SOS1 y MPK6.

Para encontrar indicios adicionales de la interacción y la regulación de SOS1 por MPK3 y MPK6, se realizaron ensayos de interacción *in vivo* entre las proteínas SOS1-MPK3 y SOS1-MPK6 mediante un ensayo de complementación bimolecular fluorescente (BiFC) en *Nicotiana benthamiana*. Para ello se clonaron MPK6 y MPK3 fusionadas al dominio C-terminal de la YFP en el vector pSPYCE(M) del sistema SPYNE/SPYCE. SOS1 se fusionó en su extremo C-terminal al dominio N-terminal de la YFP en el plásmido pSPYNE173. Como control para microscopía se fusionaron MPK6 y MPK3 a la proteína GFP completa en el vector pGPTVII.



Se transformó *A. tumefaciens* con las distintas construcciones y se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con MPK6-GFP, MPK3-GFP y las parejas SOS1-SPN/MPK6-SPC y SOS1-SPN/MPK3-SPC. La expresión transitoria en *N. benthamiana* de las fusiones GFP de las proteínas MPK6 y MPK3 (**Figura 14**) permitió observar una localización núcleo-citoplasmática de las mismas. La coexpresión de las parejas SOS1-MPK3 y SOS1-MPK6 no rindió una señal fluorescente de BiFC, indicando por tanto que la interacción de MPK3 y MPK6 con SOS1 en *N. benthamiana* no es lo suficientemente estable para poder observarse mediante esta técnica. Un trabajo previo (321) apunta a un efecto en la distribución celular y actividad de MPK3 como respuesta al tratamiento de plantas con *A. tumefaciens*, favoreciendo una migración al núcleo de la misma en respuesta a la infección bacteriana. Aunque existen múltiples trabajos en los que se han observado interacciones de MPK3 y MPK6 mediante BiFC (160, 322), ninguna de ellas se localiza en la membrana plasmática, por lo que es posible que la interacciones de BiFC con proteínas de membrana se vea comprometida por este fenómeno.

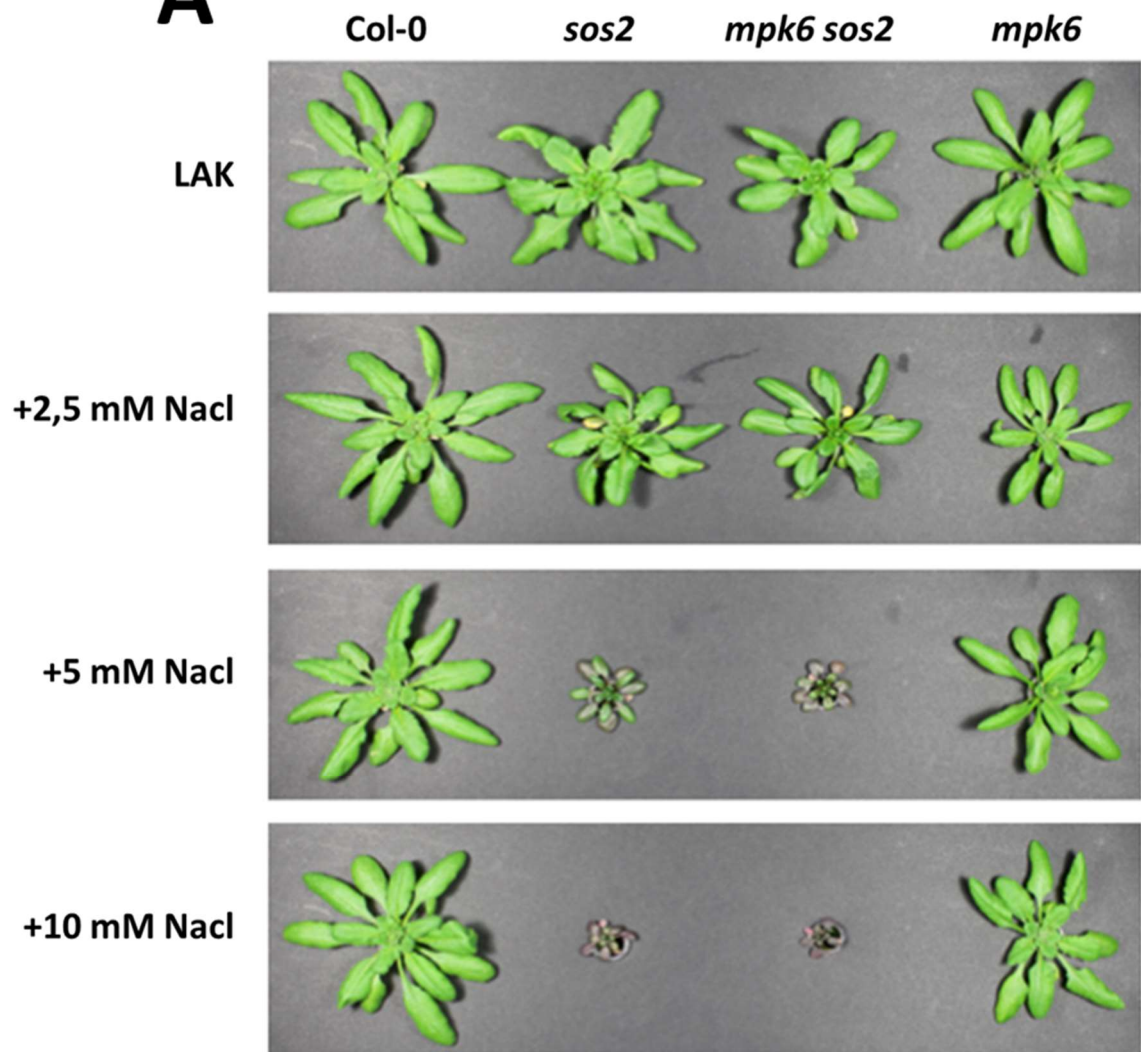


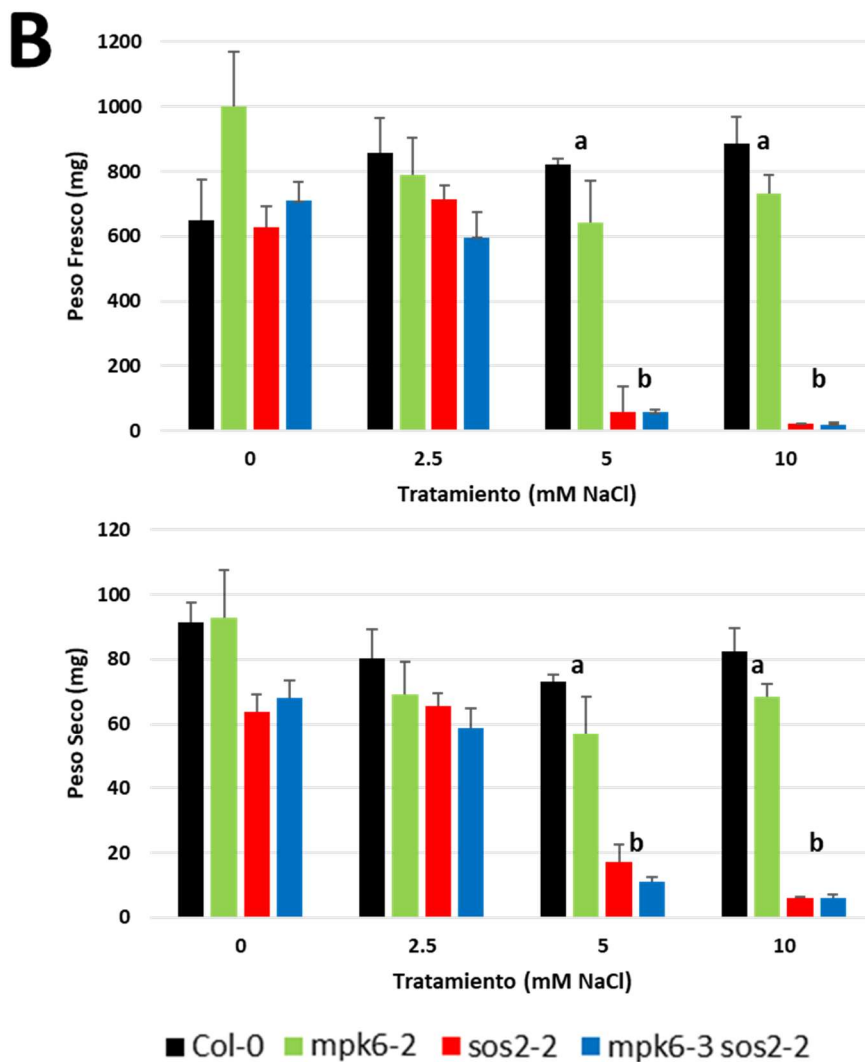
**Fig. 14 Localización e interacción de SOS1, MPK6 y MPK3.** Siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos se transformaron transitoriamente hojas de *Nicotiana benthamiana* con las fusiones MPK6-GFP, MPK3-GFP, MPK6-YFP-Ct, MPK3-YFP-Ct y SOS1-YFP-Nt bajo la regulación de un promotor 35S-CMV. Las imágenes de localización de la proteína se tomaron usando un microscopio confocal tres días después de la agroinfiltración. Las imágenes corresponden con secciones de hojas de *N. benthamiana* mostrando la distribución núcleo-citoplasmática de MPK6 y MPK3 en solitario. Los ensayos de interacción por BiFC fueron negativos en todos los casos.

Para determinar el efecto de las mutaciones de pérdida de función en los genes *MPK3* y *MPK6* sobre la actividad de *SOS1*, y por lo tanto sobre la tolerancia a la salinidad de *A. thaliana*, se comparó el crecimiento a distintas concentraciones de sal en cultivo hidropónico de plantas de mutantes *mpk3*, *mpk6*, *sos2* y de dobles mutantes *mpk3 sos2* y *mpk6 sos2*. No se pudo analizar el fenotipo del doble mutante *mpk3 mpk6* porque esas mutaciones provocan inviabilidad en fase embrionaria (323). Se utilizaron para este ensayo el ecotipo silvestre Col-0, la línea SALK\_073907 (*mpk6-2*), el mutante *sos2-2* y un doble mutante *sos2 mpk6* producto del cruce de *mpk6-3* x *sos2-2*. Aunque la línea *mpk6-3* presenta una inserción del T-DNA en un punto diferente al mutante *mpk6-2*, tanto la bibliografía (324, 325), como nuestros resultados (**Figura 17**) muestran que los dos alelos mutantes de *MPK6* tienen un comportamiento idéntico.

Las distintas líneas se crecieron durante una semana en medio LAK suplementado con 1 mM de KCl. Tras ese periodo se transfirieron a LAK suplementado con diferentes tratamientos de salinidad suave (2.5, 5 y 10 mM de NaCl). Tras tres semanas de tratamiento, se recogieron las plantas y se midió su peso fresco y seco (**Figura 15B**). A partir del tratamiento con 5 mM de NaCl, la ausencia de *SOS2* provoca un profundo efecto sobre el crecimiento de la planta en las líneas mutantes *sos2* y *sos2 mpk6*. Los mutantes simples de *mpk6*, aunque parecen ligeramente afectados con respecto al silvestre, no presentan un fenotipo de sensibilidad a sal atribuible a una inactivación de *SOS1*. La cuantificación de este fenotipo mediante las mediciones del peso fresco y seco de la parte aérea de las diferentes líneas mostró que la diferencia estadística solo identificaba dos grupos significativamente diferentes, aquellos que determinan la ausencia o presencia de *SOS2* (**Figura 15B**).

**A**

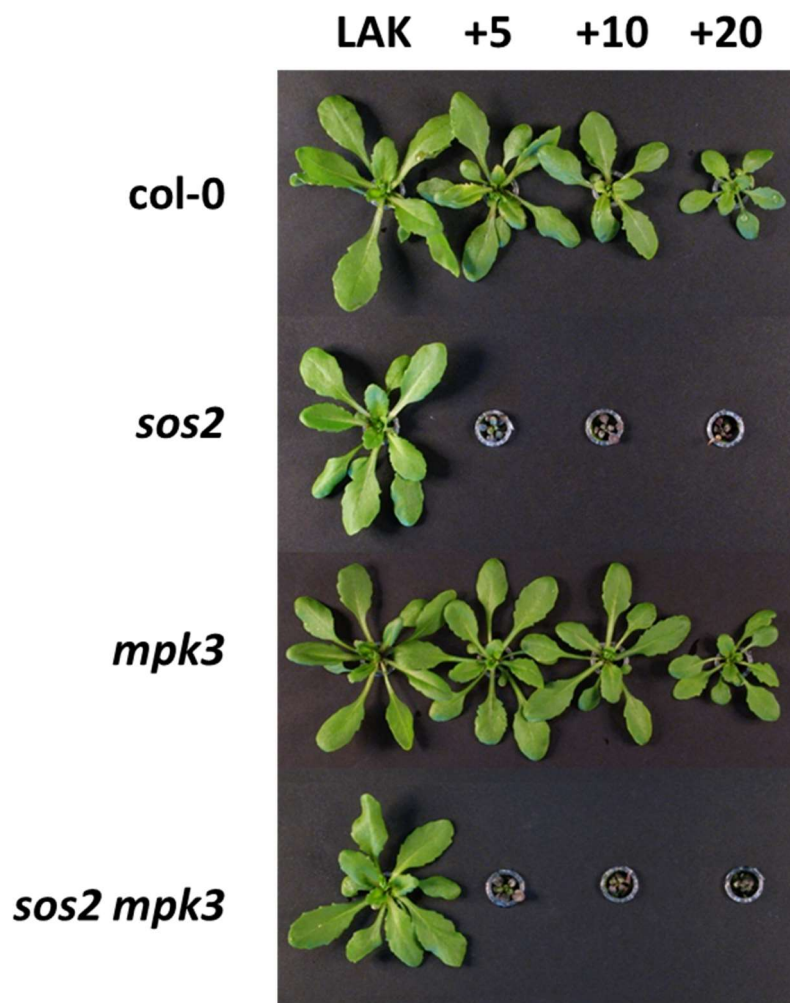




**Fig. 15 Determinación de la sensibilidad de los mutantes *mpk6* al estrés salino.** Se germinaron y crecieron en medio LAK durante dos semanas plantas de las líneas Col-0, *mpk6-2*, *sos2-2* y el doble mutante *mpk6-3 sos2-2*. Tras ese periodo se transfirieron a medio LAK suplementado con concentraciones crecientes de NaCl. **(A)** Las imágenes muestran una planta representativa de cada genotipo tras tres semanas de tratamiento salino. **(B)** Para cuantificar la sensibilidad de las distintas líneas a la presencia de sodio en el medio se recolectaron las plantas tratadas (n = 8 por cada línea y tratamiento), se eliminaron las raíces y se determinó el peso fresco de la parte aérea. Tras desecar las muestras a 40 °C, se midió su peso seco. Todas las gráficas muestran la media y el error estándar. Las letras *a* y *b* muestran los grupos con medias significativamente diferentes en un test de Tuckey (ANOVA)( $p < 0.01$ ).

Se realizó un ensayo similar con el mutante *mpk3-1*, dónde se observó que la ausencia de *MPK3* tampoco provocaba un fenotipo de sensibilidad a la sal (**Figura 16**). Al contrario de la pequeña sensibilidad a sal mostrada por las plantas *mpk6*, Las

diferencias fenotípicas en este caso no son apreciables, observándose un fenotipo idéntico del mutante *mpk3* al de la planta silvestre. Tampoco se observó que la línea doble mutante *sos2-2 mpk3-1* presentara un fenotipo de sensibilidad a la sal ligeramente incrementado respecto al del mutante *sos2-2*, aunque hubiera sido necesario probar concentraciones menores a 5 mM NaCl para mayor seguridad.



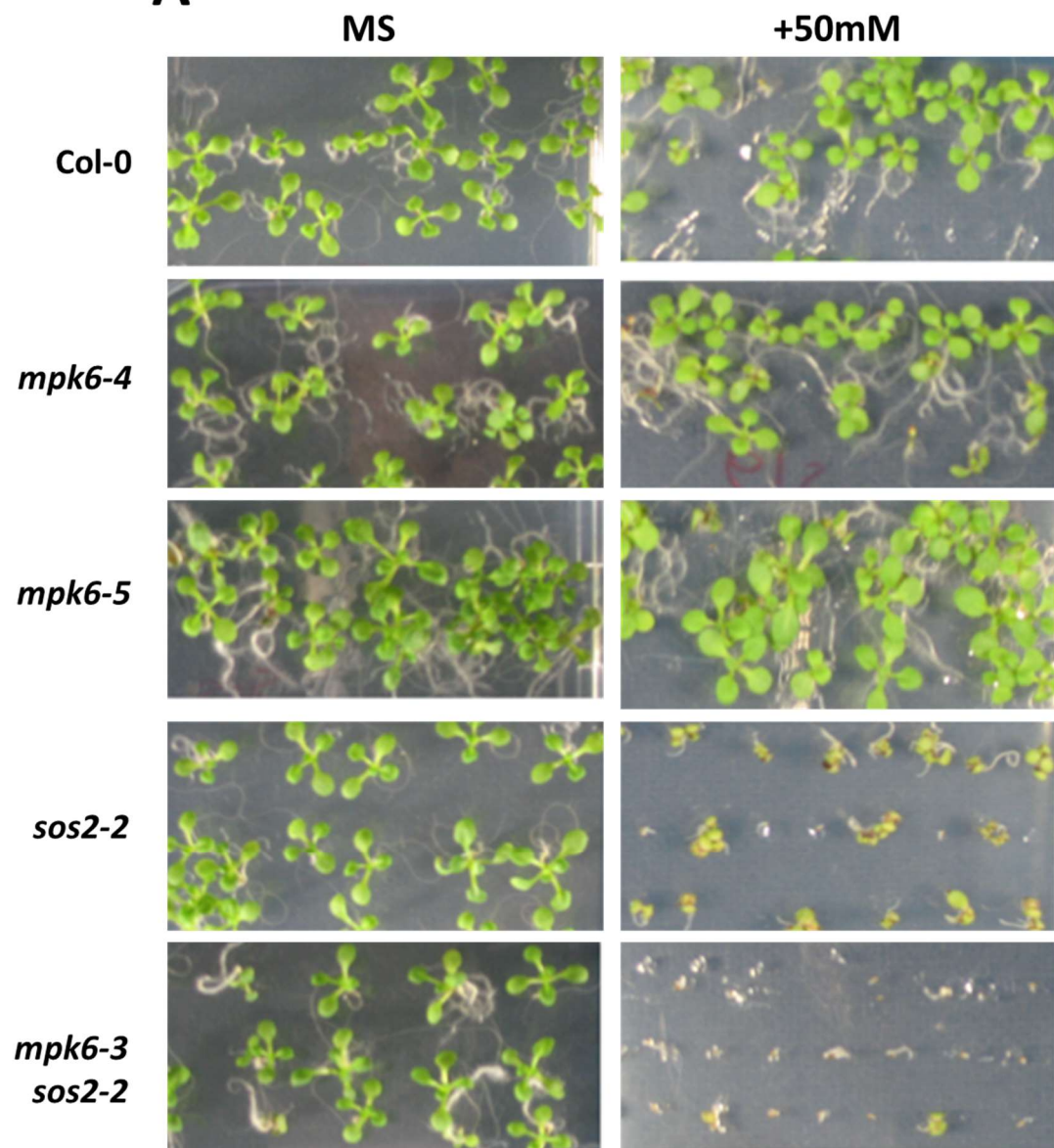
**Fig. 16 Determinación de la sensibilidad de los mutantes *mpk3* al estrés salino.** Se germinaron y crecieron durante dos semanas en medio LAK plantas de las líneas Col-0, *mpk3*, *sos2* y el doble mutante *mpk3 sos2*. Tras ese periodo se transfirieron a medio LAK suplementado con concentraciones crecientes de NaCl (5, 10 y 20 mM) para determinar su efecto sobre el crecimiento. Las imágenes muestran una planta representativa cada genotipo tras un mes de tratamiento.

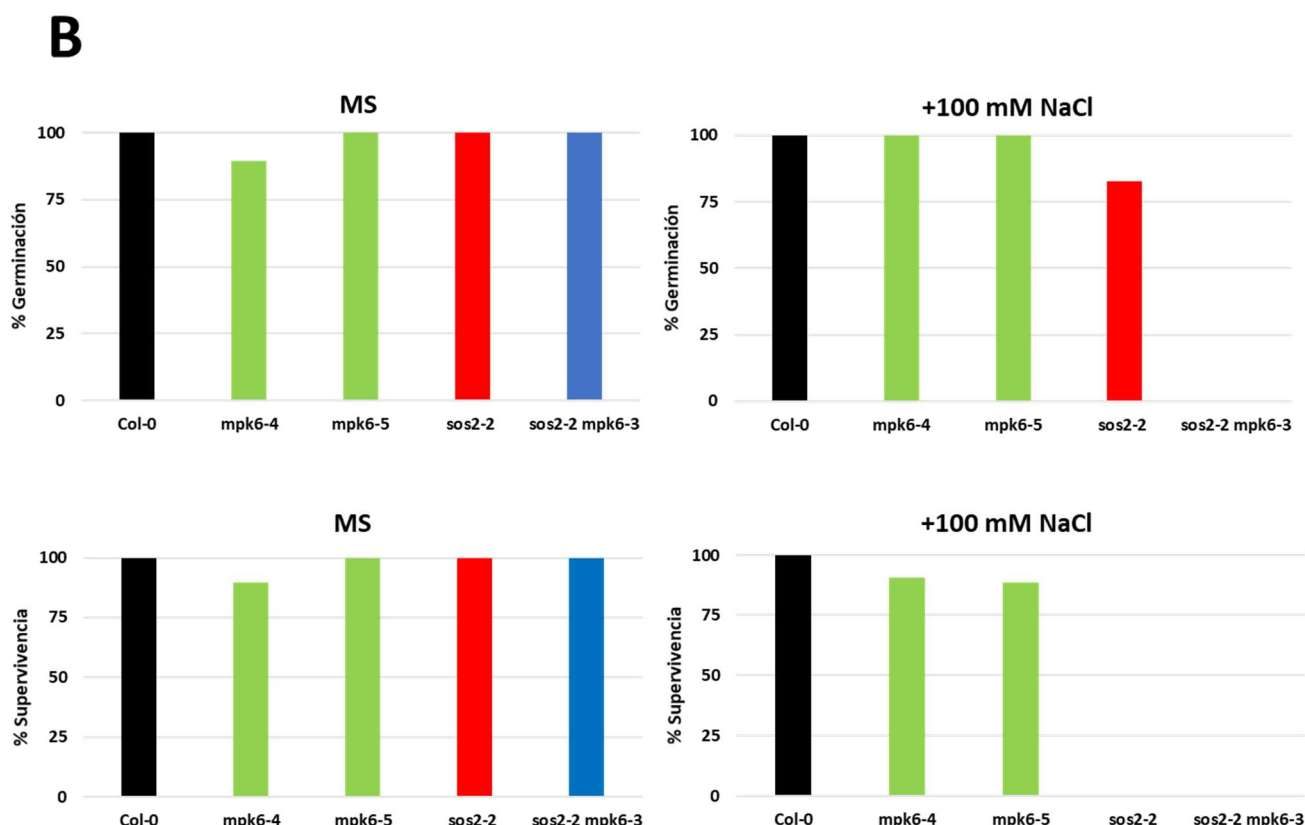
*MPK6* y *MPK3* presentan una secuencia muy similar (75,6% de identidad) (326), un patrón de expresión variable pero que presenta múltiples zonas de co-expresión incluyendo la zona de elongación del córtex de la raíz y los tejidos vasculares (185), y un funcionamiento redundante en mucho de los mecanismos regulatorios que controlan conjuntamente (157), por lo que es muy probable que la ausencia de uno de ellas quede enmascarada fenotípicamente por la actividad de la otra. Desgraciadamente el doble mutante *mpk6 mpk3* presenta un fenotipo de letalidad en el estado de embrión, por lo que determinar su fenotipo de sensibilidad a sal es imposible (323).

Como ensayo alternativo para observar el comportamiento de los mutantes *mpk6* en presencia de sal, se realizó un ensayo de germinación y crecimiento *in vitro* de dos líneas mutantes insercionales no caracterizadas previamente, *mpk6-4* (SALK\_062471C) y *mpk6-5* (SALK\_004221). Se sembraron germínulas de las distintas líneas en medio MS ½ con sacarosa y suplementado con 50 mM de NaCl, y se crecieron durante 10 días a 25 °C en régimen de día largo (**Figura 17**). Como control, se usaron las líneas Col-0, *sos2-2* y el doble mutante *mpk6-3 sos2-2*.



**A**





**Fig. 17 Germinación y supervivencia de mutantes *mpk6* y *sos2* en presencia de sal.** Para determinar el efecto de la sal sobre la germinación y el crecimiento temprano de los mutantes *mpk6-4* y *mpk6-5* se germinaron semillas en medio MS ½ con sacarosa y en el mismo medio suplementado con 100 mM de NaCl. **(A)** Imágenes representativas del comportamiento de las germinulas. Las fotografías se tomaron tras 10 días de crecimiento en día largo. **(B)** Histogramas representando el porcentaje de germinación y supervivencia (desarrollo de raíz y hojas verdaderas) de las distintas líneas ensayadas respecto a los valores de Col-0 en cada condición.

Pudimos observar que ambas líneas mutantes *mpk6-4* y *mpk6-5* presentaban unas tasas de germinación y crecimiento similar a las de la línea silvestre Col-0, coherentemente con lo observado en el experimento de crecimiento en cultivo hidropónico. Por otra parte, en el caso de los mutantes *sos2-2* y el doble mutante *sos2-2 mpk6-3* se observó un crecimiento muy afectado en presencia de sal (**Figura 17**). Es interesante que la diferencia en fenotipo entre estas dos líneas se hace más aparente en este experimento: mientras las plantas *sos2-2* logran germinar pero presentan un crecimiento muy afectado por la presencia de sal, el doble mutante *sos2-2 mpk6-3* presenta una tasa de germinación mínima.



## Activación de SOS2 por GRIK1 y GRIK2

SOS2 forma parte de la subfamilia de proteínas *SnRK3* de *A. thaliana*, proteínas quinasa con un dominio catalítico similar al de las quinasas tipo *SNF-like/AMP-activated protein kinase*. Estas quinasas contienen dentro de su región aminoterminal un lazo de activación (*T-loop*) conservado que contiene 3 residuos fosforilables que han sido descritos como fundamentales para la regulación de su actividad en otras quinasas de esta familia (194). Los trabajos de Guo et al., 2001 (216) y Gong et al., 2002 (327) determinaron que en el caso de SOS2 este lazo lo conforman los residuos serina-159, treonina-168 y tirosina-175, y que la sustitución de cualquiera de estos tres residuos por un aspartato (aminoácido cargado negativamente), inducía un aumento de la actividad de la quinasa *in vitro*.

Con estos precedentes se marcó como objetivo de esta tesis determinar el efecto fosforilación de estos aminoácidos en la actividad y regulación de SOS2, así como describir las quinasas implicadas en esta reacción y su papel en la tolerancia al estrés salino.

El trabajo descrito en esta sección de se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Hiroaki Fujii, de la Universidad de Turku, Finlandia. Algunos experimentos realizados por miembros de este grupo de investigación han sido incluidos en esta memoria pues resultan fundamentales para la interpretación global de la memoria. En esos casos, la autoría se especifica en el pie de foto de la figura correspondiente.

### Análisis del lazo de activación de SOS2.

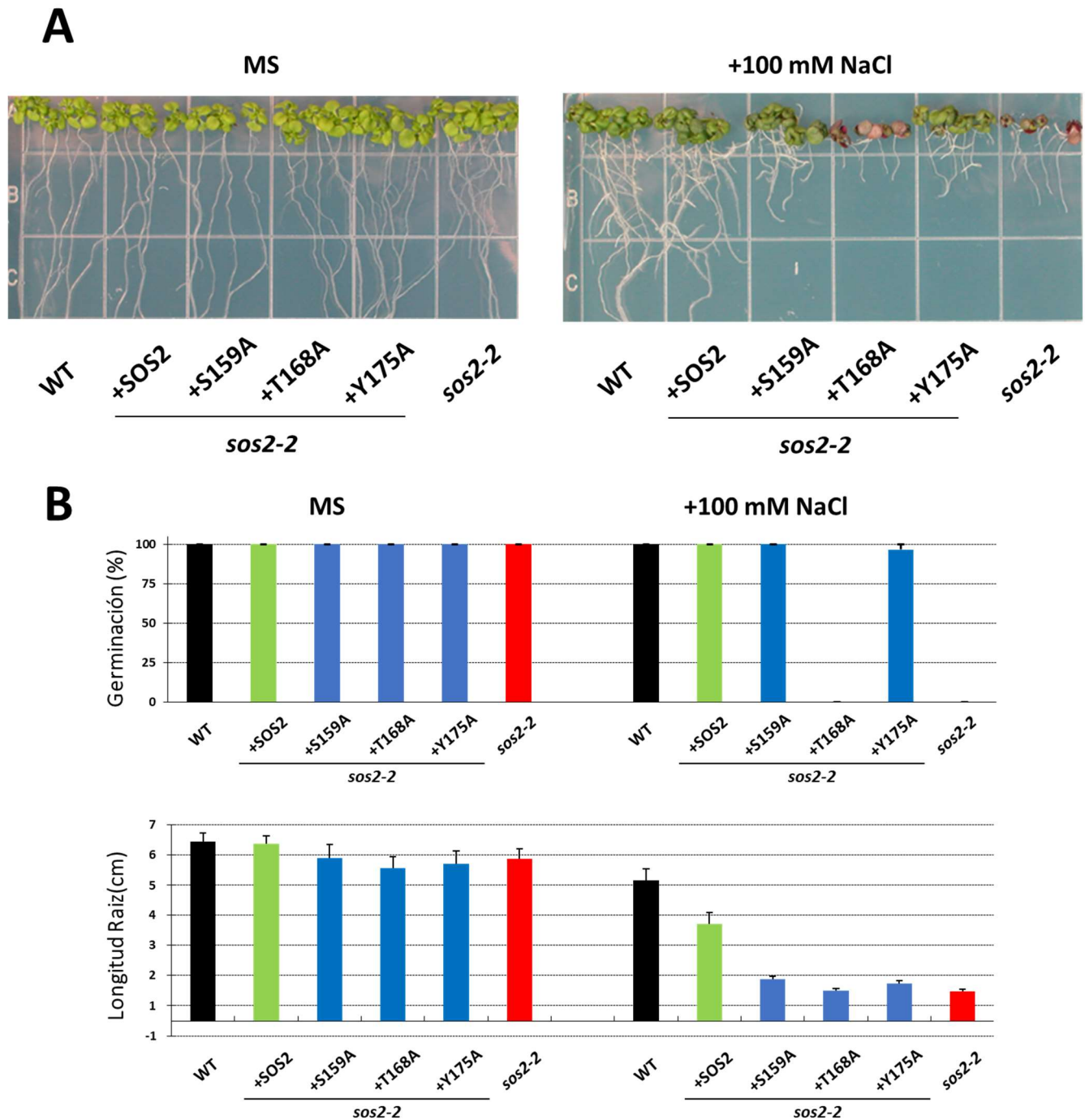
#### *Caracterización fenotípica de los mutantes S159A, T168A y Y175A de SOS2 in planta.*

Para determinar el efecto y la relevancia bioquímica de los residuos fosforilables del lazo de activación (*T-loop*) de SOS2 y si su función es determinante para la tolerancia a la salinidad, se procedió a complementar el mutante *sos2-2* con los

alelos SOS2-S159A, SOS2-T168A y SOS2-Y175A, donde cada residuo fosforilable de este lazo de activación ha sido sustituido por una alanina. Para ello se sustituyeron los residuos de interés mediante dos ciclos de mutagénesis dirigida por PCR y los fragmentos resultantes se clonaron en el vector de expresión pCAMBIA1200, con los transgenes bajo el control promotor de sobreexpresión 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV).

La generación T2 de transformantes obtenidos fueron sometidos a ensayos de germinación y de desarrollo de raíz en sal para determinar la funcionalidad de estas versiones de SOS2 en presencia de estrés salino. Las distintas líneas transgénicas, acompañadas de Col-0, el mutante *sos2-2* y el mutante *sos2-2* complementado con el alelo silvestre de SOS2, fueron sembradas en placas de Petri con medio MS sin sal o suplementadas con 100 mM de NaCl. Tras 10 días creciendo a 25 °C y bajo luz continua, se midió la tasa de germinación de cada línea (**Figura 18B**). Se observó que los mutantes S159A e Y175A eran capaces de germinar en presencia de sal a los niveles del alelo silvestre. Sin embargo, los mutantes T168A presentaban una baja tasa de germinación similar a la del mutante *sos2-2*.

Para comprobar el efecto de la sal sobre plantas ya germinadas se realizó un ensayo de elongación de la raíz. Tras germinar en placas de medio MS las distintas líneas, se transfirieron a placas frescas de MS sin sal o suplementadas con 100 mM de NaCl, donde se dejaron crecer durante 12 días, tras los cuales se cuantificó la longitud de la raíz (**Figura 18A y B**). En este caso se observó que todas las líneas mutantes presentaban un desarrollo de la raíz comprometido, ya que la elongación de su raíz era similar a la del mutante *sos2-2*. Adicionalmente se observó que el mutante T168A presentaba una sensibilidad mayor que las mutaciones S159A e Y175A, encontrándose la parte aérea también afectada por el estrés salino de una manera idéntica al mutante *sos2-2*.

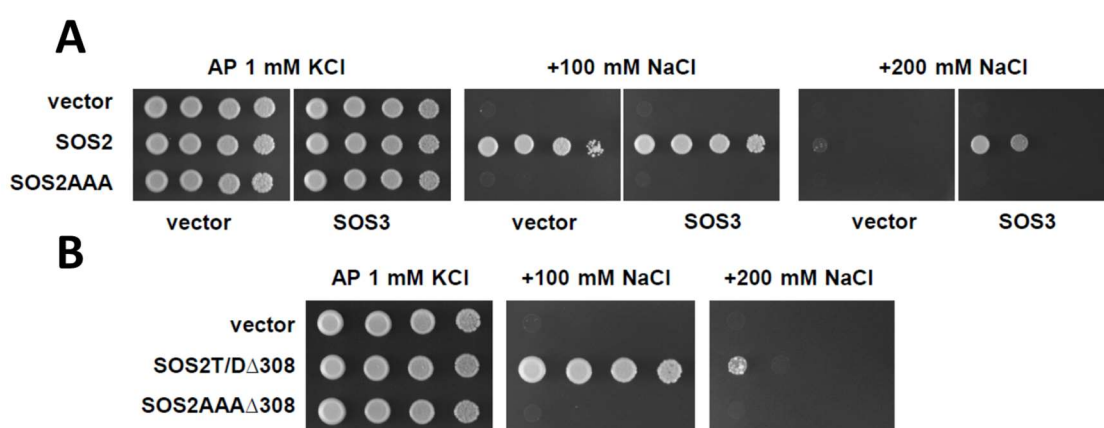


**Fig. 18 Germinación y desarrollo de los mutantes en el lazo de activación de SOS2 en presencia de sal. (A)** Para determinar el efecto de la sal sobre la germinación y el desarrollo los mutantes en el lazo de activación de SOS2, plantas mutantes *sos2-2* transformadas con SOS2 silvestre (SOS2) y las versiones mutantes a alanina en los hipotéticos sitios de fosforilación del lazo de activación S159A, T168A e Y175A fueron germinadas en medio MS o medio MS suplementado con 100 mM de NaCl. **(B)** Porcentaje de germinación y mediciones de la longitud de la raíz primaria 12 días tras la transferencia de las germínulas a medio MS y medio MS suplementado con 100 mM de NaCl. Todas las gráficas muestran la media y el error estándar. Experimento realizado en el laboratorio del Dr. Hiroaki Fujii.

Este resultado indicaría una implicación directa de la fosforilación de los residuos serina-159, tirosina-175 y treonina-168 en la activación de SOS2 frente a un estrés salino, siendo la treonina-168 la más importante en la tolerancia a este estrés.

#### *Caracterización funcional del mutante S159A T168A Y175A en levaduras.*

Para estudiar, de manera directa, las consecuencias funcionales del efecto de la mutación en los residuos de activación de SOS2 en la regulación de SOS1, procedimos a realizar un ensayo de complementación funcional reconstituyendo el sistema SOS1-SOS2-SOS3 en la levadura usando versiones silvestre y mutante de SOS2. Para ello transformamos la estirpe JP837 ( $\Delta ena1-4 \Delta nhx1 \Delta nha1 PGK1::AtSOS1::CYC1$ ) con las versiones silvestres *SOS2* y *SOS3*, además de los alelos mutantes SOS2-S159A/T168A/Y175A (en adelante SOS2-AAA), la versión hiperactiva SOS2-T168D- $\Delta 308$  y la versión híbrida SOS2-AAA- $\Delta 308$  a la que se le ha delecionado su dominio autoinhibidor y eliminado los sitios de fosforilación del lazo de activación (**Figura 19**). En el caso de SOS2-T168D- $\Delta 308$  y SOS2-AAA- $\Delta 308$  no se ensayó la co-expresión de SOS3 ya que la truncación  $\Delta 308$  elimina el sitio de unión de SOS3.



**Fig. 19 Caracterización funcional de los alelos de SOS2 con las mutaciones S156A, T168A e Y175A.** (A) Se realizaron ensayos de crecimientos la cepa de levadura JP837 (AXT3K con una inserción en el cromosoma del cDNA de *SOS1*) transformada con el vector p414GPD vacío (vector), el alelo silvestre *SOS2* o el mutado en el triplete S156A/T168A/Y175A (SOS2-AAA), en presencia y ausencia de *SOS3*. (B) Comparación de la versión constitutivamente activa de SOS2

(SOS2-T168D $\Delta$ 308) y la versión con el C-terminal truncado y mutante en los sitios S156A/T168A/Y175A (SOS2-AAA $\Delta$ 308).

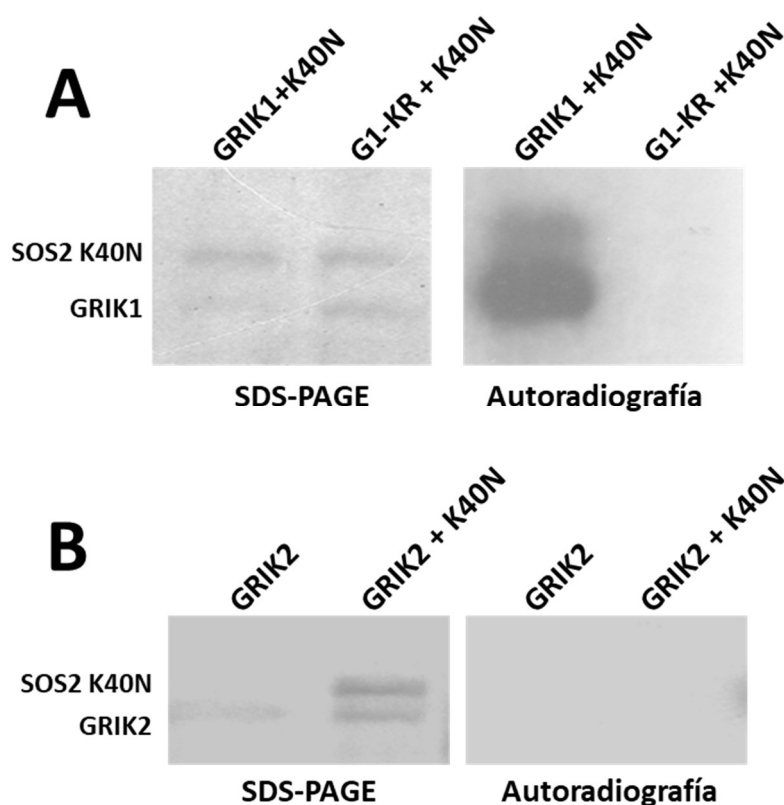
Al utilizar la versión triple mutante de SOS2-AAA el crecimiento de la levadura se vió severamente afectado en presencia de sal, indicando que esta versión mutante de SOS2 no es capaz de activar a SOS1. Igualmente, la eliminación del dominio autoinhibidor de SOS2 no incrementó la actividad de la quinasa cuando el lazo de activación no presentaba los sitios de fosforilación silvestres, indicando que la regulación por fosforilación del lazo de activación es independiente y dominante sobre la regulación por el C-terminal autoinhibidor para la activación de la quinasa.

Consecuentemente se observó que la presencia de SOS3 no aliviaba el fenotipo de sensibilidad a sal por expresión de SOS2-AAA, indicando que la interacción con la CBL, cuya función principal a nivel estructural es desplegar el dominio autoinhibidor de SOS2 (193, 231), no permite recuperar la actividad de SOS2, o que la falta de fosforilaciones en el lazo de activación de SOS2 previene la interacción con SOS3.

#### Identificación de las proteínas GRIK1 y GRIK2

Como se ha descrito en la Introducción, los estudios previos de Hong et al., 2003 (239) y Shen et al., 2006 (244), determinaron las relaciones de homología estructural y regulatoria entre las familias de quinasas de tipo SNF1/AMPK/SnRK de *S. cerevisiae*, mamíferos y *Arabidopsis*, describiendo que la conservación de la regulación de estas proteínas también se extiende a las quinasas implicadas en su activación, que presentan similitudes en su secuencia y estructura. De este modo, la búsqueda por homología en la secuencia genómica de *A. thaliana* de quinasas similares a los activadores de SNF1 (SAK1, TOS3, ELM1) o AMPK (CaMKK, LKB1), apuntó a una familia formada por dos quinasas, GRIK1 y GRIK2, que habían sido descritas previamente por Shen (230, 244) como reguladores de la actividad de las quinasas de tipo SnRK1.

Para determinar si las proteínas GRIK fosforilaban el lazo de activación de SOS2 se procedió a realizar un ensayo de fosforilación *in vitro* con proteínas purificadas. Para ello, se clonaron los cDNAs de *GRIK1* y *GRIK2* en el vector de expresión en *E. coli* pGEX4T1. Posteriormente se purificaron las fusiones a GST de GRIK1, GRIK2 y la versión mutante GRIK1-K137R a la que, por mutagénesis dirigida por PCR, se le ha sustituido la lisina-137 del sitio de unión a ATP por una arginina, eliminando así su actividad catalítica (230). Como sustrato se utilizó una versión recombinante de SOS2 a la que se le había sustituido igualmente la lisina-40 del sitio de unión a ATP por una asparagina (SOS2-K40N), obteniendo una quinasa sin actividad catalítica (276) (**Figura 20**).

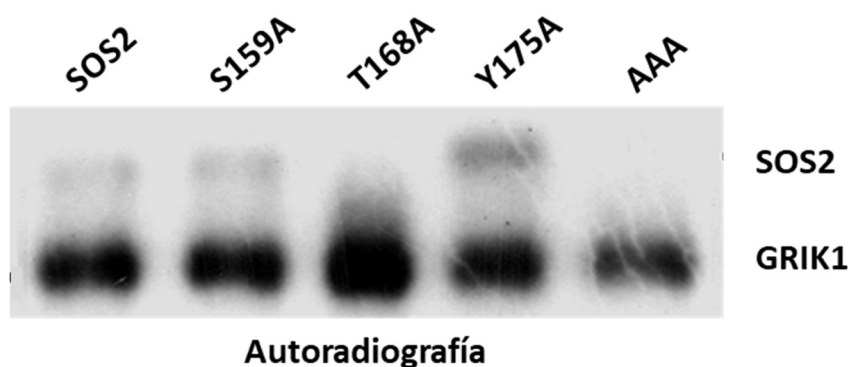


**Fig. 20 Fosforilación *in vitro* del mutante inactivo SOS2-K40N por las proteínas GRIK.** Una fusión a GST de SOS2-K40N (K40N en los paneles), que carece de actividad quinasa por mutación del sitio catalítico, se incubó con las dos quinasas homologas GRIK1 (**A**) y GRIK2 (**B**)

para un ensayo de fosforilación *in vitro* y separación de los productos de reacción por SDS-PAGE. En el caso de GRIK1 se añadió como control negativo el alelo GRIK1-K137R (G1-KR), con una mutación en el sitio catalítico de la enzima que elimina su actividad quinasa. Los paneles muestran la tinción Coomassie del gel SDS-PAGE y la placa de autoradiografía. Experimento realizado en el laboratorio del Dr. Hiroaki Fujii.

Podemos observar que mientras que GRIK1 es capaz de fosforilar a SOS2-K40N *in vitro*, GRIK2 no presenta una actividad quinasa significativa sobre SOS2 ni sobre sí misma, no pudiendo descartarse por tanto un estado inactivo de la proteína purificada. La eliminación de la actividad catalítica de GRIK1 por la mutación K137R suprime completamente la fosforilación de SOS2, así como su autofosforilación.

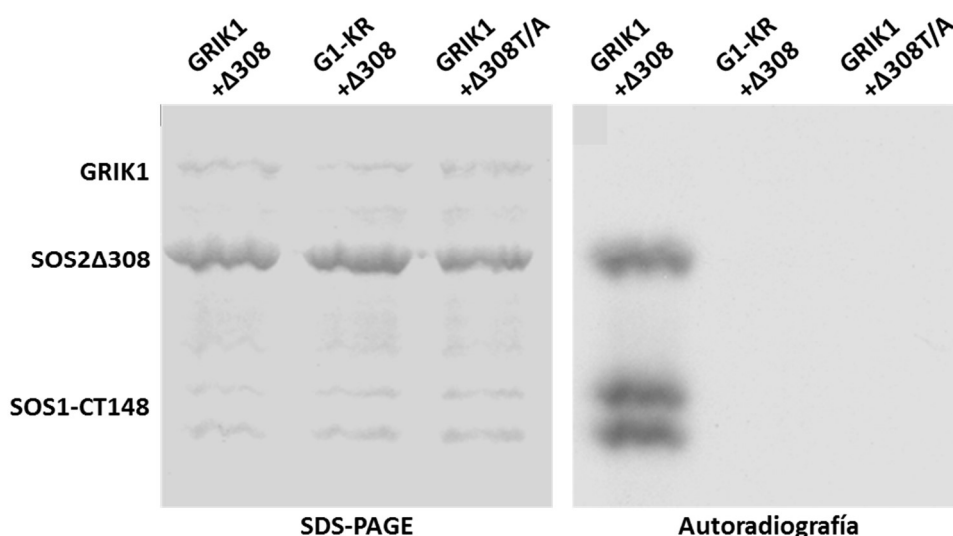
Para determinar el sitio de fosforilación por GRIK1 sobre SOS2, se procedió a repetir el ensayo de fosforilación utilizando como sustrato las fusiones GST purificadas desde *E. coli* de los alelos mutantes de SOS2 en los aminoácidos serina-159, treonina-168 y tirosina-175 mutados a alanina (SOS2-K40N-S159A, SOS2-K40N-T68A y SOS2-K40N-Y175A), además del triple mutante SOS2-AAA sin ningún residuo fosforilable en el lazo de activación de SOS2 (**Figura 21**).



**Fig. 21 Fosforilación *in vitro* de los mutantes en el lazo de activación de SOS2 por GRIK1.** Fusiones GST de SOS2 silvestre y los distintos mutantes en los residuos fosforilables del lazo de activación SOS2-S159A, SOS2-T168A, SOS2-Y175A, y el triple mutante SOS2-S159A/T168A/Y175A (SOS2-AAA) fueron incubados con la quinasa GRIK1 en reacciones de fosforilación y separados por SDS-PAGE. En la figura se muestra la placa de autoradiografía. Experimento realizado en el laboratorio del Dr. Hiroaki Fujii

GRIK1 fue capaz de fosforilar la versión silvestre de SOS2, así como las proteínas mutantes en la serina-159 (S159A) o la tirosina-175 (Y175A), pero no se observó actividad quinasa de GRIK1 sobre SOS2 cuando se eliminaron los tres residuos (AAA) o el residuo treonina-168 (T168A), lo que indica que, *in vitro*, GRIK1 fosforila a SOS2 específicamente en la treonina-168.

Para determinar el efecto de la fosforilación de GRIK1 sobre SOS2 sobre la interacción entre SOS2 y SOS1, se repitió el ensayo de fosforilación *in vitro* añadiendo como sustrato secundario una fusión GST de los últimos 148 aminoácidos del C-terminal de SOS1. Como sustrato directo de GRIK1 se utilizaron dos versiones de SOS2: la versión silvestre con una delección del dominio autoinhibidor a partir del aminoácido 308 (SOS2-Δ308), y esta misma proteína en la que además el sitio de fosforilación T168 había sido mutado a una alanina no fosforilable, SOS2-T168A-Δ308 (**Figura 22**).



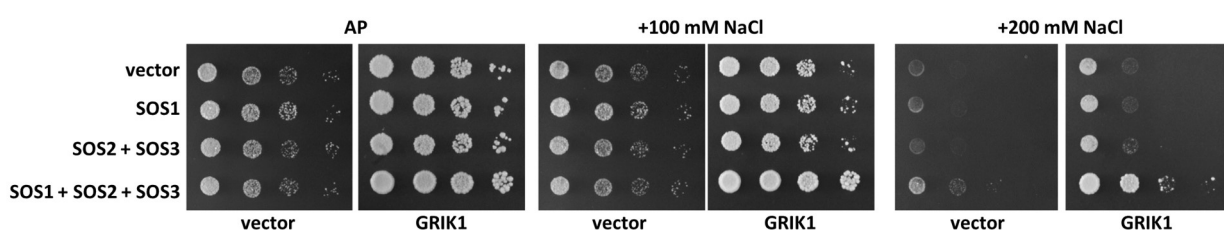
**Fig. 22 Fosforilación *in vitro* por GRIK1 de los mutantes en el lazo de activación de SOS2.** Fusiones GST de los mutantes de SOS2, SOS2-Δ308 (Δ308), SOS2-T168A-Δ308 (Δ308T/A) y del un péptido con los últimos 148 aminoácidos de SOS1 (SOS1-CT148) fueron incubados en una reacción de fosforilación con las quinasas GRIK1 y su versión inactiva GRIK1-K137R (G1-KR) como control negativo. En la figura se muestran la tinción Coomassie del gel SDS-PAGE y la placa de autoradiografía. Experimento realizado en el laboratorio del Dr. Hiroaki Fujii.



Podemos observar que SOS2 presenta actividad quinasa sobre SOS1 *in vitro* cuando es fosforilable por GRIK1. La eliminación de la actividad GRIK1 al usar el mutante K137R, o la mutación de la treonina-168 de SOS2 suprimen la fosforilación de SOS2 y del péptido de SOS1, indicando que la fosforilación de la treonina-168 de SOS2 por GRIK1 promueve la activación de SOS2 *in vitro*.

#### *Caracterización funcional de la fosforilación de SOS2 por GRIK1 en levadura.*

Para determinar el efecto de la interacción entre SOS2 y GRIK1 en la actividad de la ruta SOS *in vivo*, se realizó un ensayo de reconstitución funcional en levadura. Para evitar el fondo de quinasas endógenas activadoras de SOS2 en la levadura (239) utilizamos la cepa YPDahl55 ( $\Delta elm1 \Delta sak1 \Delta tos3$ ) que carece de las tres quinasas activadoras de proteínas *SNF-like/AMP-activated* nativas de la levadura. Para aumentar la sensibilidad de esta cepa a la presencia de sodio, se hizo una disrupción génica de los genes *ENA1* a 4 siguiendo el procedimiento descrito en (289) y eliminando así el principal sistema de extrusión de sodio de la levadura. La cepa resultante ( $\Delta 3K4E$ ) fue transformada con las versiones silvestres de las proteínas SOS1, SOS2 y SOS3, y se realizó un ensayo de crecimiento en sal (**Figura 23**).

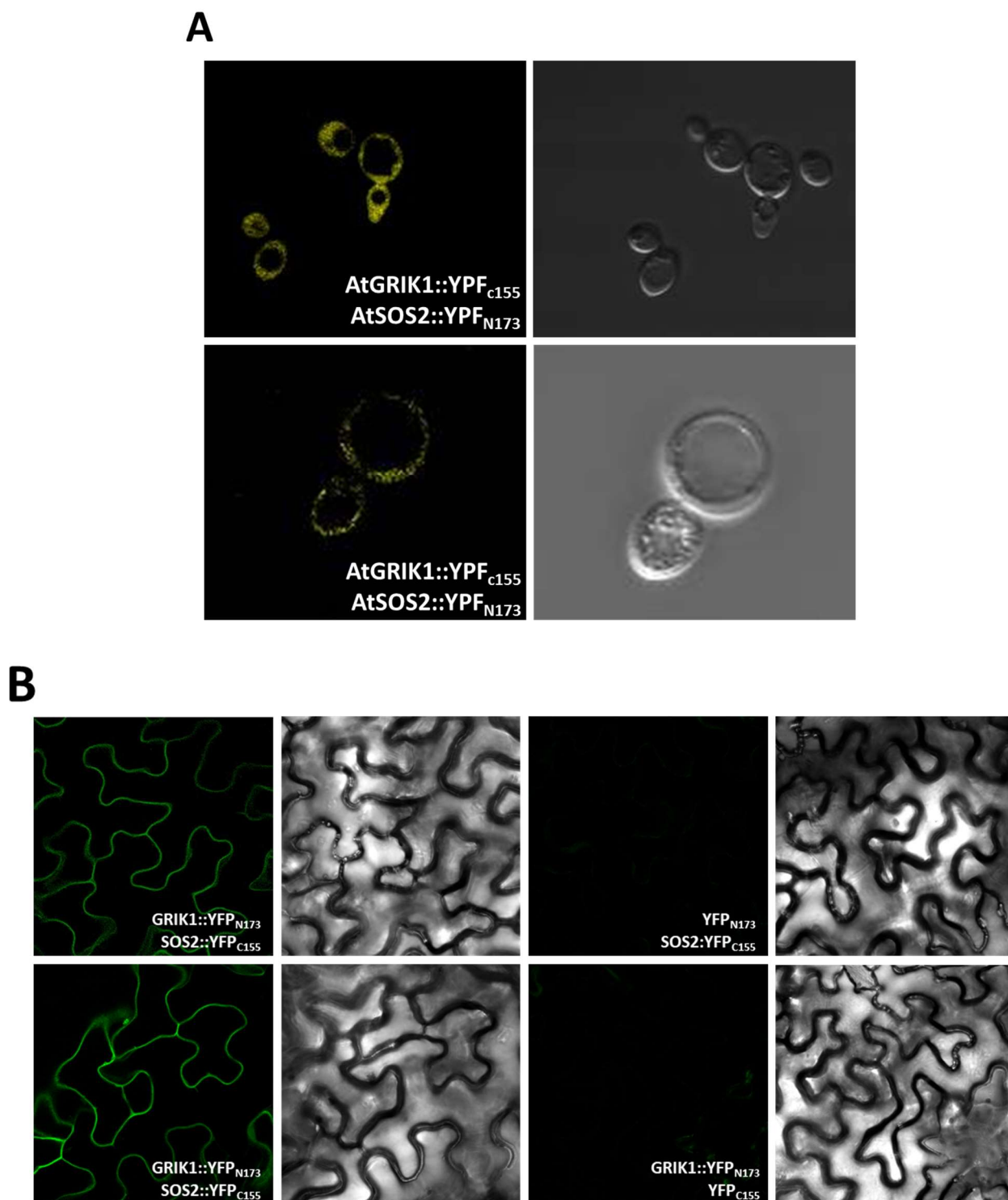


**Fig. 23 Caracterización Funcional del sistema SOS en la cepa  $\Delta 3K4$ .** Se realizaron ensayos de crecimiento de la cepa de levadura  $\Delta 3K4$  ( $\Delta elm1 \Delta sak1 \Delta tos3 \Delta ena1-4$ ) transformada con *SOS1*, *SOS2* y *SOS3* en presencia y ausencia de *GRIK1*. El medio sintético AP se suplementó con 1 mM de KCl y la concentración de NaCl indicada en cada panel. *SOS1* se clonó en el vector pYPGE15, *SOS2* y *SOS3* se clonaron en pFLT y *GRIK1* en el vector p425GPD.

En ausencia de ELM1, SAK1 y TOS3, el sistema SOS no fue capaz de restituir el crecimiento de la levadura en presencia de sal, observándose un crecimiento idéntico tanto en la levadura complementada únicamente el antiportador (SOS1) como en la que expresa los tres miembros del sistema SOS (SOS1 + SOS2 + SOS3). En presencia de GRIK1 sí se restableció el crecimiento de las células que expresaban las proteínas SOS, indicando un papel directo de GRIK1 en la activación de SOS1 mediada por SOS2 *in vivo*.

Para obtener detalles acerca de la localización subcelular de la interacción entre SOS2 y GRIK1, se procedió al subclonaje de ambas quinasas en los vectores para BiFC pYeBYN (SOS2) y pYeBYC (GRIK1), fusionadas en fase con el dominio N-terminal y C-terminal respectivamente de la proteína YFP. Ambas construcciones fueron co-transformadas en la cepa AXT5 y se procedió a su observación en el microscopio confocal (**Figura 24A**). Se obtuvo una fuerte señal de fluorescencia en todo el citoplasma de la levadura, indicando una interacción de ambas proteínas en este espacio celular. GRIK1 presenta un sitio putativo de palmitoilación, lo que supondría una posible localización en la membrana plasmática, pero si esta localización se da en la levadura no parece relevante para la interacción con SOS2, o bien la sobreexpresión de ambas proteínas enmascara este proceso ya que esta modificación postraducciona está regulada y es reversible. También es posible que GRIK1 no sea palmitoilada cuando se expresa en la levadura.

Posteriormente, se realizaron fusiones similares en los vectores de BiFC de expresión en planta (pSPYNE173-GRIK1 y pSPYCE(M)-SOS2) y se procedió a agroinfiltrar plantas de *N. benthamiana*. La coexpresión de ambos genes permitió observar que *in planta*, la interacción también presentaba una localización predominantemente citoplasmática (**Figura 24B**).



**Fig. 24 Interacción de SOS2 y GRIK1.** (A) La cepa AXT5 de *S. cerevisiae* se transformó con las fusiones traduccionales SOS2-YFP-Nt y GRIK1-YFP-Ct. Las imágenes de localización de la proteína se tomaron usando un microscopio confocal y muestran una localización citoplasmática de la interacción entre las quinasas. (B) Se transformaron transitoriamente hojas de *N. benthamiana* con plásmidos expresando las fusiones traduccionales SOS2-YFP-Ct, t y GRIK1-YFP-Nt bajo la regulación de un promotor 35S de CMV. Las imágenes se tomaron usando un microscopio confocal tres días después de la agroinfiltración y muestran secciones

de hojas de *N. benthamiana* con una distribución citoplasmática del complejo entre SOS2 y GRIK1.

#### Análisis del fenotipo de las plantas mutantes *grik1* y *grik2*.

Para determinar la contribución a la tolerancia al estrés salino de los genes *GRIK1* y *GRIK2* se obtuvieron plantas homocigóticas de las líneas de mutantes de la colección SALK por inserción de T-DNA en los loci *At3g45240* y *At5g60550*, correspondientes a los genes *GRIK1* y *GRIK2* respectivamente, así como del doble mutante producto del cruce de ambas líneas. Concretamente se utilizaron las líneas SALK\_142938 (con una inserción en el primer intrón de *GRIK1*) y SALK\_015230 (inserción en el 8º exón de *GRIK2*).

Para determinar el efecto de la salinidad sobre los mutantes *grik1* y *grik2* se realizó un cultivo hidropónico en medio LAK suplementado con concentraciones crecientes de sodio (5, 10 y 20 mM de NaCl). En cada tratamiento se crecieron 8 plantas de cada genotipo, y como controles se utilizó Col-0 como línea silvestre y el mutante *sos2-2*. Las plantas crecieron durante una semana en medio hidropónico LAK con 1 mM de KCl, a 25 °C en un régimen de día largo. Tras ese periodo se añadieron los diferentes tratamientos y tras tres semanas se cosecharon las plantas y se midió su peso fresco y seco. Tras las tres semanas de tratamiento, se observaron tres grupos fenotípicos diferenciados a simple vista (**Figura 25**). Las plantas mutantes *sos2-2* presentaban un crecimiento muy reducido, incluso en el tratamiento de salinidad más leve (5 mM NaCl), acompañado de una acumulación de antocianinas en los tejidos aéreos de la planta. El resto de plantas, aunque afectadas diferencialmente en su crecimiento, no presentaban un fenotipo tan marcado como las plantas *sos2-2*, indicando que la ausencia de SOS2 tiene un efecto sobre el crecimiento de la planta mayor que la ausencia de cualquiera de sus activadores.

En el caso de *grik2*, se observó que las plantas eran capaces de crecer de manera similar al silvestre Col-0, no viéndose comprometido su desarrollo más allá de las variaciones normales para una planta silvestre en los distintos tratamientos. Este resultado, junto a la ausencia de actividad quinasa en los ensayos de fosforilación *in*

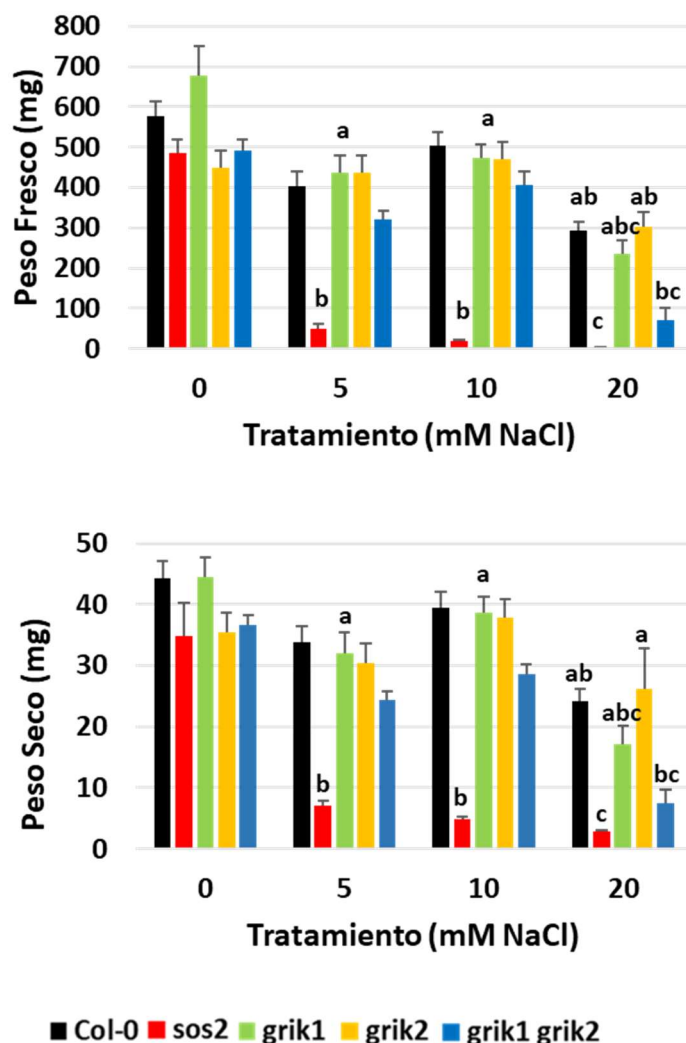
*vitro* podría indicar que GRIK2 no es un regulador esencial para la activación de SOS2 en presencia de estrés salino, o directamente que no existe una interacción entre ambas proteínas en condiciones normales, aunque esto último no se ha comprobado experimentalmente.

A su vez, el mutante *grik1* no presentaba un fenotipo de sensibilidad a concentraciones bajas de sal (5 y 10 mM NaCl), pero sí se observó una reducción de su crecimiento en comparación a la línea silvestre a concentraciones de sal más severas (20 mM NaCl).

**A**



**B**



**Fig. 25 Determinación de la sensibilidad de los mutantes *grik1* y *grik2* al estrés salino.** Se germinaron y crecieron durante una semana plantas de las líneas Col-0, *sos2-2*, *grik1*, *grik2* y el doble mutante *grik1 grik2* en medio LAK. Tras ese periodo se transfirieron a medio LAK suplementado con concentraciones crecientes de NaCl indicadas (en mM) para determinar el efecto sobre el crecimiento. **(A)** Imágenes representativas de la respuesta de los distintos genotipos ensayados. **(B)** Para cuantificar la sensibilidad de las distintas líneas a la presencia de sodio en el medio se recolectaron las plantas tratadas (n = 8 por cada línea y tratamiento), se eliminaron las raíces y se procedió a determinar el peso fresco y seco de la parte aérea. Las gráficas muestran la media y el error estándar. La notación *a*, *b*, y *c* indica los grupos de distribución estadística significativos de acuerdo a un Test de Tuckey (ANOVA) ( $p < 0.01$ ).

La eliminación de ambos genes *GRIK1* y *GRIK2* produjo una reducción del crecimiento de las plantas a todas las concentraciones de sal, pero especialmente a 20 mM de NaCl donde las plantas presentan una reducción estadísticamente significativa

respecto a los mutantes simples y el silvestre. No obstante, el efecto de tratamiento salino en el crecimiento del mutante *grik1 grik2* no es tan severo como en el mutante *sos2*.

En conjunto estos resultados parecen indicar una función relevante en la tolerancia al estrés salino por parte de la pareja de proteínas quinasas GRIK1 y GRIK2, siendo la actividad de GRIK1 la fundamental en la activación de SOS2. GRIK2 parece tener una contribución menor, que es sólo visible de forma aditiva en ausencia del activador principal GRIK1.

#### Interacción de GSO1 con el sistema SOS.

Los estudios previos de la proteína GSO1 se han centrado en su efecto sobre la arquitectura del desarrollo de la raíz (260, 261) o en su efecto sobre la formación de la banda de Caspari (262, 263), focalizándose estos últimos en las consecuencias sobre la nutrición mineral de la mutación *gso1*. Sin embargo, no existe ningún trabajo que haya determinado la relación de esta proteína con la tolerancia a la salinidad, aunque el mutante *gso1* presenta unos niveles alterados de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>. Resultados previos del laboratorio del Dr. Yan Guo han determinado que SOS2 interacciona con la proteína GSO1 en un ensayo de doble híbrido en levaduras (comunicación personal). Es por ello que en este trabajo hemos estudiado el efecto del estrés salino sobre el mutante *gso1* y explorado una posible relación con el sistema de tolerancia SOS.

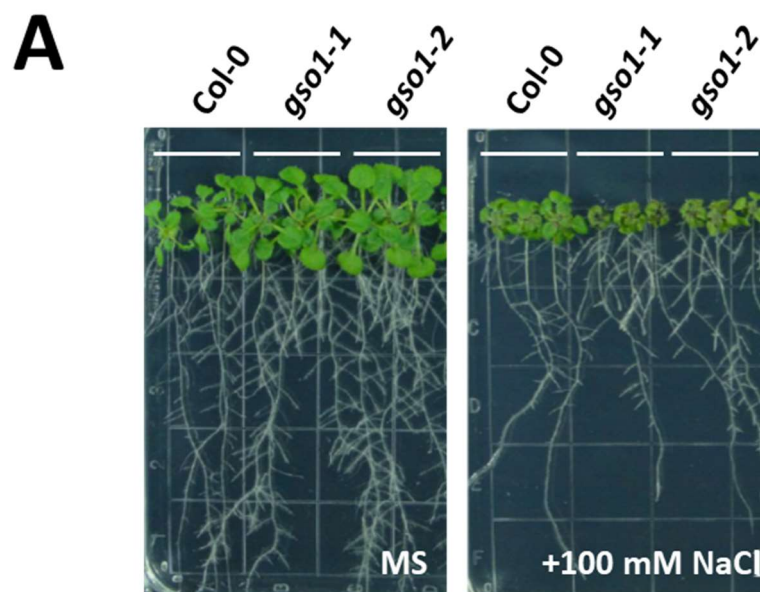
El trabajo recogido en esta sección se ha realizado en colaboración con el grupo del Dr. Yan Guo, de la China Agricultural University en Pekin. Algunos experimentos realizados por miembros de este grupo de investigación han sido incluidos en esta memoria pues resultan fundamentales para la interpretación global de la memoria. En esos casos, la autoría se especifica en el pie de de la figura correspondiente.

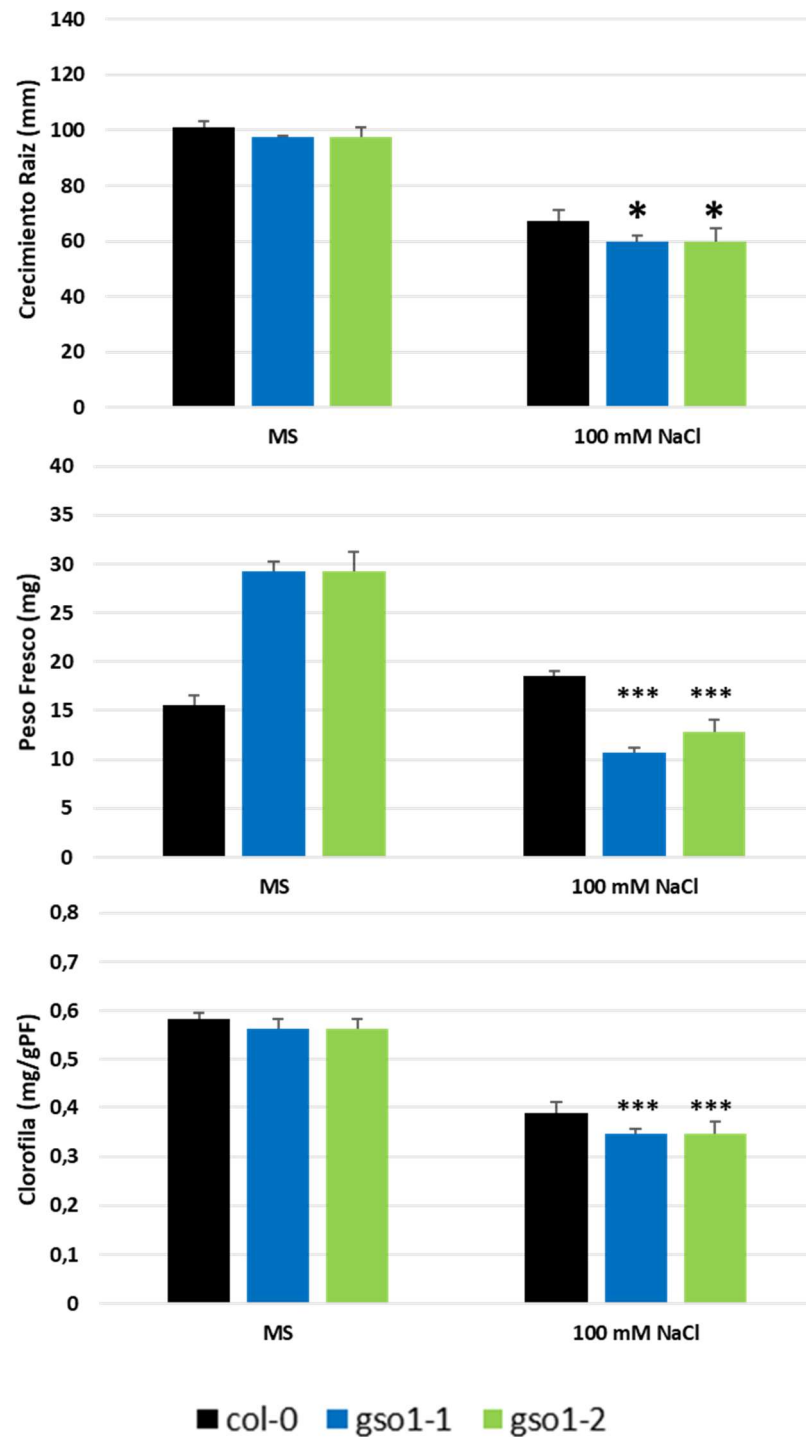
#### Caracterización fenotípica del mutante *gso1* bajo tratamiento de estrés salino.



Para determinar los efectos de la salinidad en el crecimiento y desarrollo de los mutantes *gso1* se utilizaron las líneas mutante *gso1-1* (SALK\_064029) y *gso1-2* (SALK\_103965), con el T-DNA inserto en los extremos 5' y 3', respectivamente, del primer exón de *GSO1* (*GSO1* solo presenta un intrón, muy cerca de su extremo 3'). Las líneas fueron fijadas con la mutación en homocigosis y se comprobó mediante RT-PCR que en ninguna de ellas existía expresión de *GSO1*.

Para observar las posibles diferencias en el crecimiento y desarrollo de la raíz, se realizó un ensayo *in vitro* de crecimiento de raíz con las líneas silvestre (Col-0) y ambas líneas mutantes *gso1*. Para ello se germinaron en placas de MS plantas de cada una de las líneas y se transfirieron posteriormente a placas de MS suplementado con 100 mM de NaCl, donde se dejaron crecer durante 10 días. Tras este periodo se procedió a cuantificar las diferencias en el desarrollo de la raíz, peso fresco y contenido en clorofila, ya que los mutantes *gso1* presentaban un claro defecto en la pigmentación de la parte aérea en presencia de sal (**Figura 26**).



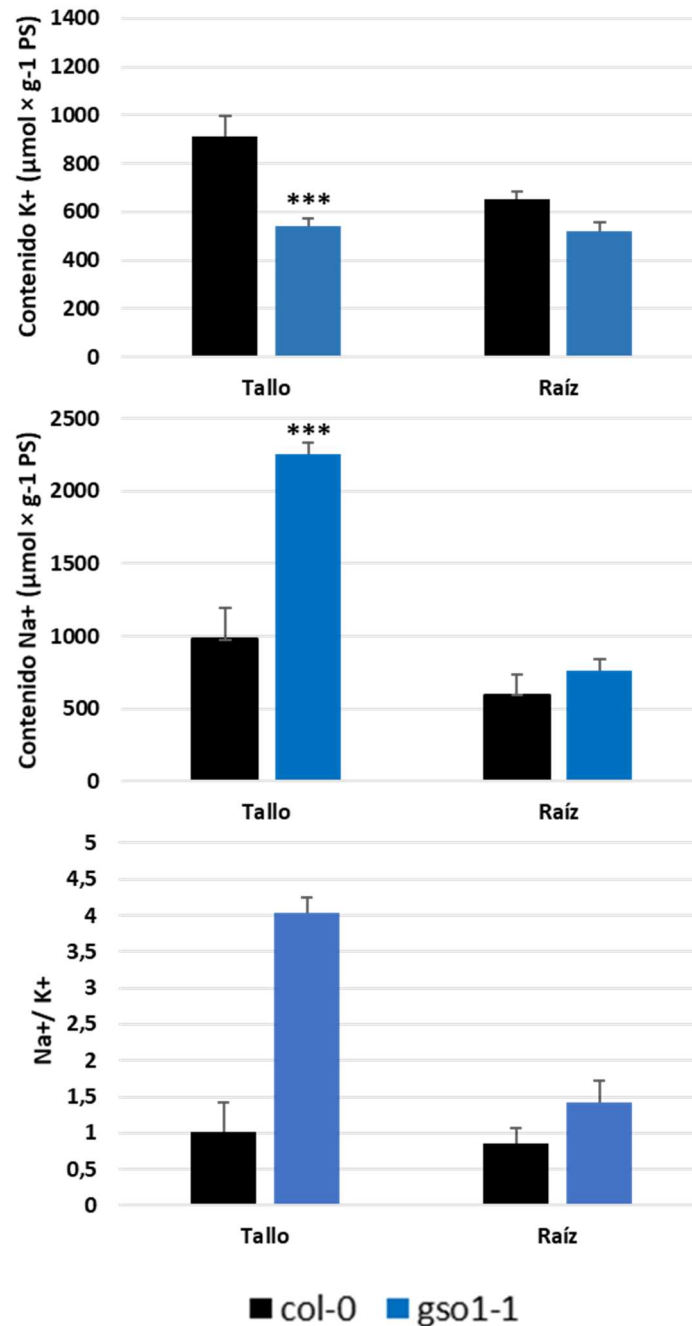
**B**

**Fig. 26 Determinación de la sensibilidad de los mutantes *gso1* al estrés salino.** (A) Se germinaron y crecieron durante dos semanas plantas de las líneas *Col-0*, *gso1-1* y *gso1-2* en placas con medio MS. Tras ese periodo se transfirieron a medio MS suplementado con 100 mM NaCl para determinar el efecto sobre el crecimiento. Las imágenes muestran plantas representativas de cada genotipo tras 10 días de tratamiento. (B) Cuantificación del peso fresco (mg), crecimiento de la raíz (cm) y concentración de clorofila (mg/gPF). \* indica  $p < 0,05$

\*\*\*  $p < 0,001$  mediante un test T de Student. Experimento realizado en el laboratorio del Dr. Yan Guo.

Los mutantes *gso1* presentaban una visible afectación del crecimiento, sobre todo en la coloración y tamaño de sus tejidos aéreos, no así en el crecimiento de la raíz. La cuantificación del peso fresco y contenidos en clorofila mostraron diferencias significativas con los de las plantas silvestres. Estos resultados indican que el sodio provoca un efecto negativo en el crecimiento de los mutantes *gso1* y que los efectos de la sal afectan preferencialmente a la parte aérea de la planta.

Para determinar los contenidos iónicos en los mutantes *gso1* se procedió a crecer en tierra mutantes *gso1* en paralelo con plantas silvestres Col-0. Tras una tres semanas de crecimiento, se suplementó el agua de riego con sal (150 mM) durante 10 días, tras lo cual se trataron las muestras y se midió el contenido en  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  de parte aérea y raíces (**Figura 27**).



**Fig. 27 Determinación del contenido iónico del mutante *gso1*.** Se añadió sal al tratamiento de riego de plantas Col-0 y *gso1* crecidas en suelo. Tras tres semanas se cosechó el material vegetal, se separó el tejido aéreo de la raíz y se determinó el contenido iónico de cada tejido mediante espectrometría de masas. \*\*\* indica  $p < 0,001$  mediante un test-T de Student. Experimento realizado en el laboratorio del Dr. Yan Guo.

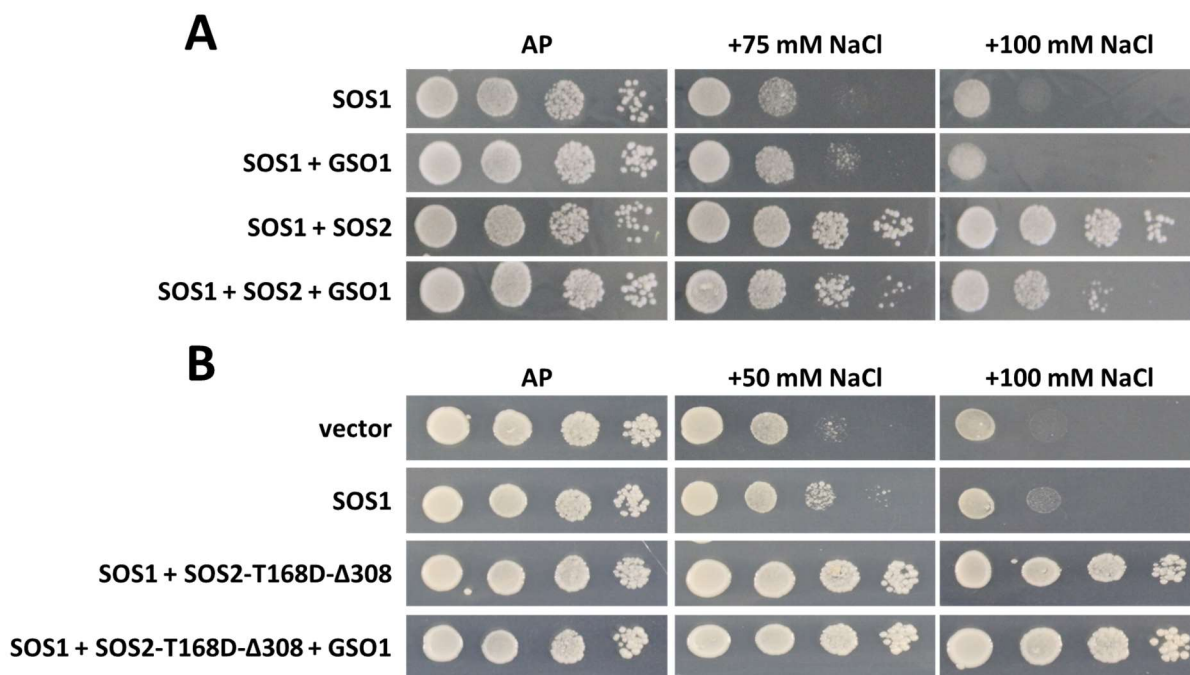
El estudio de los contenidos iónicos mostró una acumulación preferencial del sodio en la parte aérea de la planta en los mutantes *gso1*. Mientras que el contenido

en sodio de la raíz no variaba significativamente en el mutante con respecto al silvestre, la parte aérea de las plantas *gso1* acumulaba hasta 2,5 veces el contenido observado en las plantas Col-0. El tratamiento salino en la raíz no tenía un efecto significativo en la captación de potasio por el mutante, que se mantenía en los mismos niveles que el silvestre, pero si producía una disminución de los niveles de potasio en la parte aérea, existiendo una ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  4 veces mayor en los mutantes *gso1*.

El efecto de la mutación *gso1* en los contenidos iónicos de sodio y potasio en raíces y tallos sugiere un defecto en el transporte de larga distancia de ambos iones. La acumulación de sodio en la parte aérea podría indicar un efecto de GSO1 sobre las actividades de SOS1 o HKT1, proteínas fundamentales en la carga y recirculación de sodio en el xilema de *Arabidopsis*.

#### Caracterización funcional de la interacción de GSO1 con el sistema SOS.

GSO1 interacciona físicamente con SOS2 (Dr. Yan Guo, comunicación personal). Para determinar el efecto *in vivo* de una la interacción de GSO1 con proteínas del sistema SOS, reconstituimos el sistema en la cepa AXT5 de levadura expresando el cDNA de *GSO1* subclonado en el vector de expresión en levadura p425GPD. *SOS1* y *SOS2* se clonaron en los vectores pYPGE15 y p414GPD, respectivamente. Se cuantificó el crecimiento de los transformantes obtenidos mediante un ensayo de crecimiento en medio AP suplementado diferentes concentraciones de NaCl (**Figura 28A**).



**Fig. 28 Caracterización funcional de la interacción GSO1 con el sistema SOS.** (A) Se realizaron ensayos de crecimiento de levadura con la cepa de levadura AXT5 transformada con *SOS1*, *SOS2*, además de *GSO1*. El medio sintético AP se suplementó con 1 mM de KCl y la concentración de NaCl indicada en cada panel. *SOS1* se clonó en el vector pYPGE15, *SOS2* en el vector p414GPD y *GSO1* el vector p425GPD. En (B) se muestra el efecto sobre la interacción al sustituir *SOS2* silvestre por el alelo mutante constitutivamente activo *SOS2-T168D-Δ308*.

Observamos que la expresión conjunta de *SOS1*, *SOS2* y *GSO1* reducía la tolerancia de la levadura con respecto a la expresión de la pareja *SOS1/SOS2*, indicando una reducción de la actividad de *SOS2* y, consecuentemente, de la activación de *SOS1*. Cabe destacar que la actividad de *SOS2* no desaparece completamente, pudiendo observarse un transporte por parte de *SOS1* en presencia de *SOS2* y *GSO1* que es superior al basal.

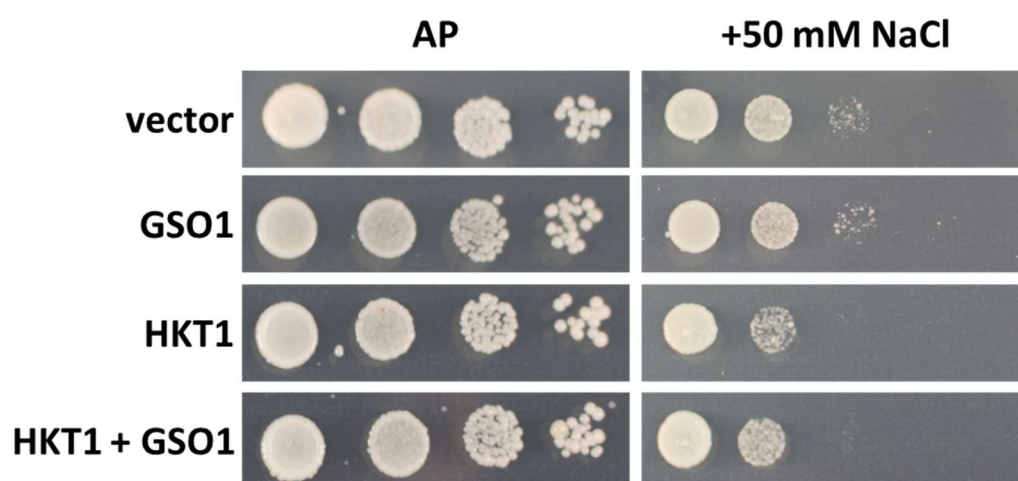
Para determinar la jerarquía de la regulación mediada por *GSO1* con el resto de mecanismos reguladores de *SOS2* conocidos (fosforilación del lazo de activación y autoinhibición por el dominio FISL) se sustituyó la forma silvestre de *SOS2* por su versión hiperactiva *SOS2-T168D-Δ308* (Figura 28B). En este caso el efecto inhibitorio que produce *GSO1* sobre *SOS2* desaparece, pudiendo observarse crecimiento de las levaduras transformadas con *SOS2-T168D-Δ308* hasta 100 mM de NaCl. Este resultado

indica que la posible inhibición de SOS2 por GSO1 se ve comprometida por la ausencia de dominio C-terminal y/o por la ausencia de la treonina-168 de SOS2.

#### Caracterización funcional de la interacción de GSO1 con HKT1.

El otro mecanismo responsable de la regulación de los niveles de acumulación de sodio en la parte aérea de *Arabidopsis* es el transportador HKT1, que facilita la salida de sodio del xilema y reduce su transporte al tallo, por lo que procedimos a determinar si GSO1 modulaba de alguna manera la actividad de HKT1.

Para validar esta hipótesis, procedimos a transformar la cepa con el cDNA de *HKT1* de *A. thaliana*, clonado en el vector pDR195, junto al cDNA de *GSO1* en el vector p425GPD. La tolerancia a la sal de los transformantes obtenidos se determinó en un ensayo de crecimiento en medio AP suplementado con concentraciones crecientes de NaCl (**Figura 29**). En este caso, el efecto de HKT1 sobre la levadura es un incremento de la sensibilidad al sodio ya que el transportador incrementa el flujo de entrada de sodio al interior celular (328).

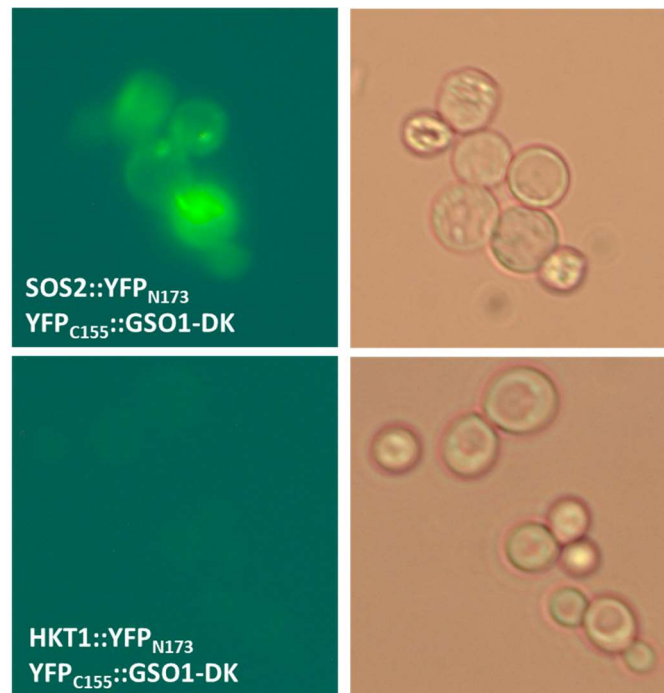


**Fig. 29 Caracterización funcional de la interacción GSO1 – HKT1.** Se realizaron ensayos de crecimiento de la cepa de levadura AXT3K transformada con cDNAs de *HKT1* y *GSO1*. El medio sintético AP se suplementó con 1 mM de KCl y la concentración de NaCl indicada.

En la **Figura 29** se muestra como la expresión de HKT1 de *A. thaliana* reduce levemente la tolerancia a sal de AXT3K. Sin embargo, la coexpresión de GSO1 no modifica el nivel de tolerancia, lo que indica que no existe un efecto regulador directo de GSO1 sobre HKT1 en levadura.

Para corroborar las interacciones funcionales entre GSO1, HKT1 y SOS2, se co-expresaron en la levadura AXT5 las distintas fusiones traduccionales de las tres proteínas a fragmentos de YFP para ensayos BiFC. En los experimentos previos realizados por el Dr. Guo usando el sistema de dos híbridos de la levadura entre GSO1 y SOS2 se eliminó el dominio extracelular y transmembrana de GSO1 que podría interferir con este ensayo. Por tanto, se subclonó en el vector pYeBYC el dominio quinasa carboxiterminal de GSO1 (GSO1-DK), fusionándolo al C-terminal de la YFP. Como interactores se ensayaron SOS2 y HKT1, clonados ambos en el vector pYeBYN y fusionados al N-terminal de la YFP. Los transformantes resultantes se crecieron en medio mínimo YNB hasta saturación y se observaron bajo el microscopio de fluorescencia (**Figura 30**). GSO1 interactuó con SOS2 en todo el citoplasma de la levadura. Por el contrario, no observamos ninguna interacción entre HKT1 y GSO1. Estos resultados confirman la interacción física entre GSO1 y SOS2 encontrada por el ensayo de doble híbrido en levaduras (Dr. Yan Guo, comunicación personal) y sugieren que el dominio quinasa de GSO1 no interacciona con HKT1 en la levadura, lo que es consistente con la falta de un efecto fenotípico observable de GSO1 sobre la actividad de HKT1.

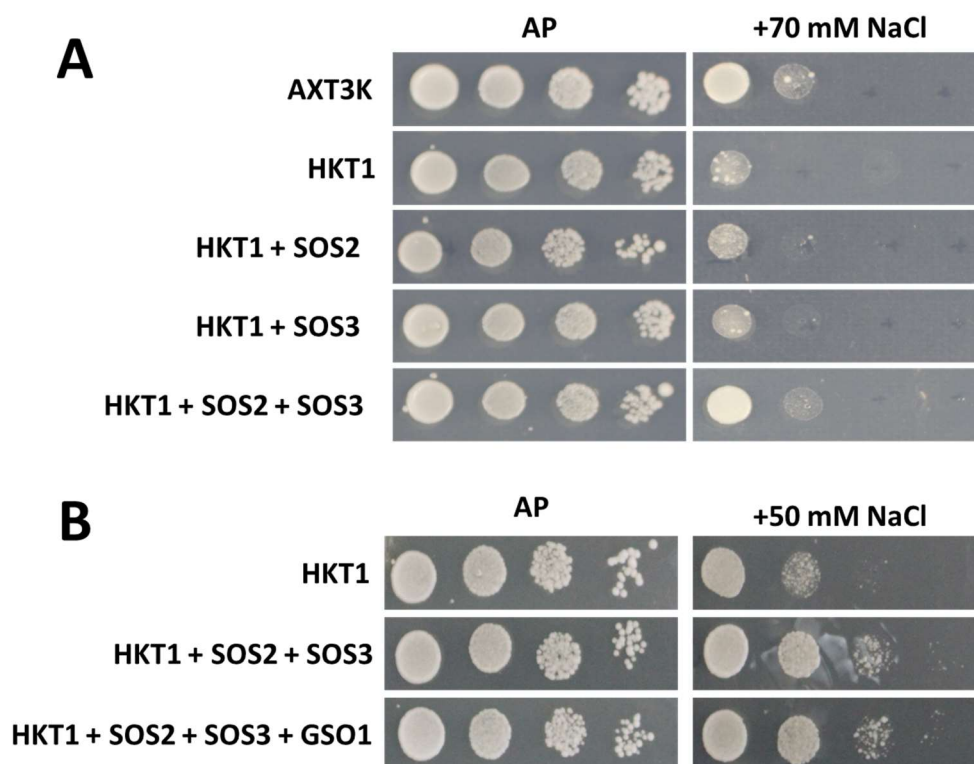




**Fig. 30 Interacción de GSO1 con SOS2 y HKT1.** Para corroborar los fenotipos observados al coexpresar GSO1 con SOS2 y HKT1, se subclonó el dominio quinasa carboxiterminal de GSO1 (GSO1-DK) en el vector pYeBYC, obteniendo la fusión GSO1-DK-YFP<sub>C155</sub>. Esta construcción se co-transformó en la cepa AXT5 junto a las fusiones SOS2-YFP<sub>N173</sub> o HKT1-YFP<sub>N173</sub> (pYeBYN). Las imágenes tomadas usando un microscopio de epifluorescencia muestran una localización citoplasmática de la interacción entre SOS2 y GSO1-DK (*panel superior*) y la ausencia de interacción entre HKT1 y GSO1 (*panel inferior*).

Como GSO1 no presentó ningún efecto directo sobre la actividad de HKT1 en la levadura pero sí se observó una modulación de la actividad de SOS2 por interacción directa con GSO1, se consideró un posible efecto de GSO1 sobre la actividad de HKT1 mediada por SOS2. Para ensayar esta posibilidad, se co-expresó HKT1 en la levadura con SOS2 y con SOS3 individualmente, y con ambas proteínas simultáneamente en un experimento de complementación de la cepa AXT5 similar a los mostrados anteriormente (**Figura 31**).

Observamos que SOS2 y SOS3 no tenían un efecto directo sobre la actividad de HKT1 por separado, pero la co-expresión del par SOS2/SOS3 produjo un crecimiento de AXT5 similar al de la cepa control, sugiriendo una reducción de la actividad de HKT1 mediada por la interacción con el complejo SOS2/SOS3.



**Fig. 31 Caracterización funcional de la interacción HKT1 – SOS – GSO1.** Se realizaron ensayos de crecimiento de levaduras con la cepa de levadura AXT5 transformada con *HKT1* (en pDR195), *SOS2* (en p414GPD), *SOS3* (en pFLT) además de *GSO1* (en p425GPD). El medio sintético AP se suplementó con 1 mM de KCl y la concentración de NaCl indicada en cada figura. **(A)** Muestra el efecto inhibitorio de la pareja SOS2/SOS3 sobre HKT1. En **(B)** se muestra que la coexpresión de *GSO1* no produce ningún efecto sobre la regulación de HKT1 por SOS2/SOS3.

Para determinar si GSO1 tenía algún efecto sobre esta posible interacción, se co-expresó también GSO1 en las células que contenían SOS2, SOS3 y HKT1 (**Figura 31B**). Se observó que la presencia de GSO1 no modificaba el comportamiento de la levadura respecto a las que expresaban las otras tres proteínas, descartando también una modulación de HKT1 por GSO1 mediante la inhibición de SOS2.

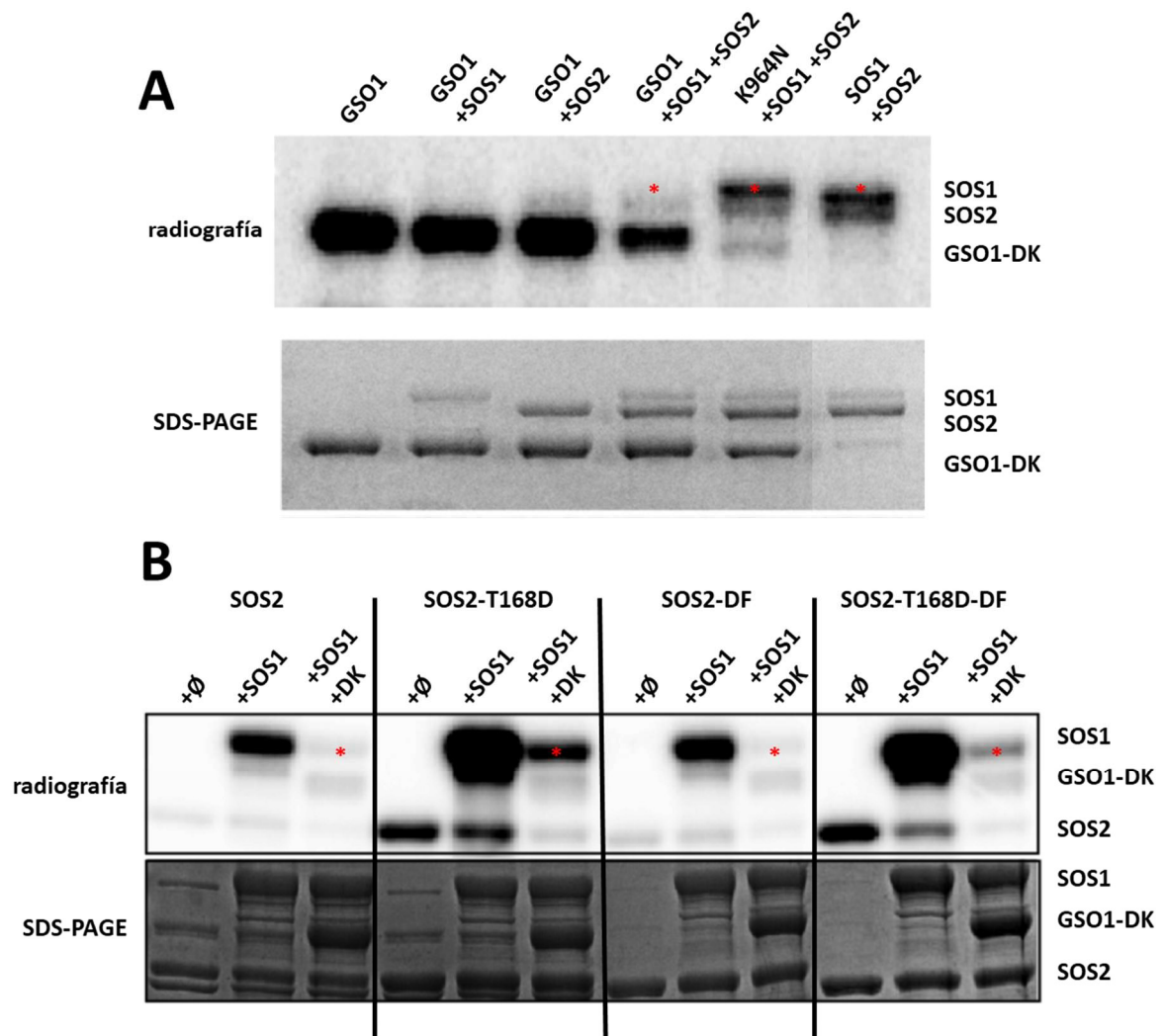
## Efecto de GSO1 sobre la actividad quinasa de SOS2.

Para determinar el efecto de GSO1 en la actividad quinasa de SOS2 se diseñaron una serie de experimentos de fosforilación *in vitro* con GSO1, SOS2 y SOS1. Para ello, se clonaron en el vector de expresión en *E. coli* pGEX4-T2 el dominio quinasa de GSO1 (GSO1-DK) y su versión mutante sin actividad quinasa por sustitución de la lisina-964 del sitio quinasa catalítico (K964N) (Dr Yan Guo, no publicado). Estas proteínas se acompañaron de las versiones silvestre de SOS2 y de los distintos mutantes de la quinasa, SOS2-T168D, SOS2-DF y SOS2-T168D-DF. Los mutantes DF son el producto de eliminar el dominio FISL de autoinhibición presente en las CIPKs. Al igual que los mutantes  $\Delta 308$ , la delección del dominio FISL produce una proteína hiperactiva, pero esta versión conserva el resto del C-terminal regulatorio de SOS2 (231) que podría mediar la interacción con GSO1 (**Figura 28**). Como sustrato de fosforilación de SOS2 se utilizó el péptido formado por los últimos 300 aminoácidos del C-terminal de SOS1.

En el primero de los ensayos se comprobó el efecto de GSO1 sobre la actividad quinasa de SOS2 sobre SOS1 (**Figura 32A**). La fosforilación de SOS1 por SOS2 desaparece en presencia de GSO1 (GSO1 +SOS1 +SOS2), pero no al utilizar la versión quinasa muerta de GSO1 (K964N +SOS1 +SOS2). Adicionalmente, se observó que el dominio quinasa de GSO1 no fosforila a SOS1, consecuentemente con la falta de efecto *in vivo* que observamos en la **Figura 28**.

Para determinar la interacción de GSO1 con los dominios regulatorios conocidos de SOS2, realizamos ensayos de fosforilación utilizando distintas versiones mutantes de SOS2 (**Figura 32B**). La sustitución de la treonina-168 por un aspártico (SOS2-T168D) suprimía la inhibición de SOS2 mediada por GSO1, observándose un aumento tanto de la autofosforilación de SOS2 como de la fosforilación de SOS1 con respecto a SOS2 silvestre en presencia de GSO1. La eliminación del dominio FISL (SOS2-DF) no variaba la inhibición de SOS2 por parte de GSO1, comportándose de manera similar al SOS2 silvestre en presencia de GSO1. Sorprendentemente, el doble mutante SOS2-T168D-DF, presenta un estado intermedio de activación en presencia de GSO1,

en el que puede fosforilar a SOS1 pero su actividad es menor que la del mutante simple SOS2-T168D. El conjunto de estos resultados nos indica que el efecto de GSO1 sobre la actividad de SOS2 tiene lugar a través del dominio quinasa catalítico N-terminal de la CIPK, ya que la activación de la misma provocada por la sustitución de la treonina-168 por un aspártico suprime la inhibición de SOS2, mientras que SOS2-DF es inhibida por GSO1.



**Fig. 32 Modificación de la actividad *in vitro* de SOS2 por GSO1.** (A) SOS2, purificada como una proteína de fusión a GST, se incubó en una reacción de fosforilación con el dominio quinasa de GSO1 (GSO1-DK) o con la versión mutante GSO1-K964N sin actividad quinasa. En todos los casos se usó una truncación N-terminal de GSO1 para eliminar los dominios extracelular y transmembrana de la proteína nativa. Como sustrato reportero de la actividad de SOS2 se utilizó un péptido formado por los últimos 300 aminoácidos del C-terminal de SOS1. (B) Fusiones Hexa-His de SOS2 y sus versiones mutantes SOS2-T168D, SOS2-DF y SOS2-T168D-DF se incubaron con el dominio quinasa de GSO1 (GSO1-DK) y el péptido C-terminal de SOS1 como

sustrato para SOS2. Se muestran la autoradiografía y la tinción Coomassie. Los asteriscos indican la localización de SOS1, independientemente de su estado de fosforilación.

En resumen, la regulación de la actividad de SOS2 por GSO1 afecta a la actividad antiportadora de SOS1 en levadura, pero no a la de HKT1, con la que no existe interacción, al menos de su dominio quinasa. La ausencia de GSO1 induce la acumulación del sodio en la parte aérea de la planta, lo que compromete su capacidad de crecimiento, probablemente debido al efecto tóxico de la acumulación de sodio. El crecimiento de la raíz no se modifica significativamente en el mutante *gso1* en presencia de sodio cuando las germínulas se cultivan in vitro.



## Discusión

La ruta SOS es uno de los mecanismos fundamentales para la tolerancia al estrés salino en las plantas superiores (271). El mecanismo de funcionamiento y regulación de las proteínas de esta ruta ha sido objeto de estudio intensivo en los últimos años, dando origen a un modelo mecanístico de detoxificación citoplasmática y transporte de larga distancia del sodio necesario para la supervivencia de las plantas a situaciones de estrés sódico (65). El estudio de la regulación de los componentes del sistema SOS ha permitido determinar que la ruta no constituye un automatismo de supervivencia *ad hoc* para las plantas, sino que la movilización del sodio mediada por la ruta SOS responde a una plétora de señales ambientales y del desarrollo que son integradas a diferentes niveles (hasta el momento transcripcional, traduccional y post-traduccional), lo que permite regular con precisión los contenidos iónicos del interior celular y espacio apoplástico, muy relevantes en los procesos de desarrollo y adaptación de la planta.

En ese sentido, este trabajo se centra en la regulación de los dos componentes cuantitativamente más relevantes en la tolerancia al sodio en *Arabidopsis*, SOS1 y SOS2 (271). El control en la actividad de estas dos proteínas mediante quinasas de tipo MAPK, LRR-RLK y GRIK supone una señal inequívoca de la interacción entre el proceso de control de los niveles de sodio y la regulación de la arquitectura y el metabolismo de la raíz.

### Regulación de SOS1 por MAPKs

Los estudios en la regulación de la actividad de SOS1 han demostrado que la activación por SOS2 se produce mediante la fosforilación del extremo C-terminal del antiportador por parte de esta quinasa, induciendo, probablemente, un cambio conformacional en la estructura del dominio autoinhibidor que provoca el incremento del intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (220). La comparación de la secuencia C-terminal de SOS1 de

distintas especies permitió observar que tanto el dominio de autoinhibición como el sitio de fosforilación SOS2 se encontraban conservados en los distintos ortólogos, sugiriendo una fuerte conservación de este mecanismo de regulación entre todas las especies vegetales. La conservación del motivo VRIDSPSKI, que es diana de la quinasa SOS2, incluía en todos los casos un sitio de fosforilación por MAPKs asociado (motivo SP), lo que sugería un papel relevante de esta serina en la activación de SOS1 por MAPKs o en la modulación de la fosforilación de SOS1 por SOS2. Los ensayos bioquímicos en levaduras y la complementación del mutante *sos1* de *Arabidopsis* con el alelo mutante SOS1-DAPS, en el que la serina 1136 se cambió a alanina, permitió demostrar que la ausencia de este aminoácido suprimía la actividad del antiportador (220).

La complementación de la cepa de *S. cerevisiae* AXT3K, carente de los principales transportadores que confieren resistencia a sodio, nos ha permitido observar de manera directa los efectos de las mutaciones en el C-terminal de SOS1 sobre su actividad transportadora. El estudio de los mutantes de sustitución de la Ser-1136 mostrado en la **Figura 9** indica que la sustitución de la serina 1136 por una alanina (mutación DAPS) provoca la desaparición completa de la activación de SOS1; un efecto similar a la doble sustitución de las serinas 1136 y 1138 (mutación DAPA), lo que indica que la fosforilación del sitio Ser-1136 tiene un papel fundamental en la activación de SOS1. La actividad del mutante SOS1-DDPS demuestra que la sustitución de la serina 1136 por un aspártico no produce ningún efecto sobre la regulación por SOS2 *in vivo*, observándose un fenotipo idéntico al del alelo silvestre de SOS1. Este dato sugiere que la mutación DDPS, que mimetiza el estado fosforilado de SOS1 en la serina 1136, no tiene consecuencias aparentes sobre la regulación por SOS2. Curiosamente, la sustitución de la serina 1138 por una alanina, que impide la fosforilación por SOS2, no suprime completamente la actividad de SOS1, observándose cierta mejora de la actividad en presencia de SOS2 (**Figura 9**). Tomados conjuntamente, los datos sobre la activación por SOS2 de las variantes de SOS1 en el sitio DAPS indican que la fosforilación de la serina 1136 es un prerequisite para la fosforilación de la serina 1138 por SOS2 que parece favorecer la interacción física entre SOS1 y SOS2.



En Quintero et al., (2011)(222) se sugiere que la fosforilación del dominio DSPS de SOS1 impide la actuación de su dominio autoinhibidor C-terminal. Sin embargo, los resultados con la variante DDPD de SOS1 indican que el mero cambio conformacional provocado por residuos de aspártico en los sitios 1136 y 1138 no es suficiente para elevar los niveles de actividad de SOS1 de manera constitutiva y todavía es necesaria la presencia física de SOS2 para la completa activación de SOS1. El hecho de que la máxima actividad de SOS1 se logre por la co-expresión del mutante fosfomimético DDPD junto con SOS2 sugiere fuertemente que la unión de SOS2 al C-terminal de SOS1 es necesaria para el desplazamiento del dominio autoinhibidor C-terminal presente en SOS1 (**Figura 9B**).

Estos resultados permiten conjeturar acerca del proceso de activación de SOS1 a través de la fosforilación del sitio DSPS. Un posible modelo para explicar estos resultados es considerar que SOS1 es activado secuencialmente por dos rutas de proteína quinasas, una de las cuales finaliza con la fosforilación del sitio Ser-1138 (SOS2/SOS3) y otra que finaliza con la fosforilación del Ser-1136 por MAPKs. La unión de SOS2 y la fosforilación del sitio 1138 inducirían la actividad de SOS1 mediante la inactivación de su dominio autoinhibidor, siendo crítica para este proceso de reconocimiento la actividad previa de las quinasas tipo MAPK que actuarían fosforilando la serina 1136.

Los ensayos mostrados en la **Figura 13** indican que las quinasas MAPK endógenas de la levadura son capaces de fosforilar la Ser-1136 de SOS1, permitiendo la reconstitución del sistema SOS en ausencia de MAPKs de *Arabidopsis*. La purificación de fragmentos del C-terminal de SOS1 desde la levadura producía dos poblaciones de proteínas con una diferencia en su peso molecular atribuible a una reacción de fosforilación (**Figura 13A**). El tratamiento de estas proteínas con fosfatasa alcalina suprimía la población de proteínas de mayor tamaño, al igual que lo hacía la purificación del C-terminal del alelo mutante DAPS (**Figura 13B y C**). La purificación del C-terminal de distintas cepas mutantes de distintas MAPK de la levadura (*hog1*, *fus3*, *ste11*) seguía produciendo bandas dobles debidas a fosforilación, por lo que no logramos determinar la identidad de la quinasa implicada en la fosforilación de este sitio (**Figura 13C**). Debido a esto, no nos fue posible determinar con exactitud la

relevancia de la fosforilación de la serina 1136 por MPK3 y MPK6 en la reconstitución del sistema SOS en levaduras.

Para determinar de una manera directa la probable regulación de SOS1 por MAPKs, se co-expresaron en *S. cerevisiae* SOS1 con las tres quinasas de la familia MAPK implicadas en la respuesta al estrés salino en *Arabidopsis* (MPK3, MPK4, MPK6), y se observó que tanto MPK3 como una versión activada de MPK6 (MPK6-Y144C) inducían la actividad del antiportador SOS1 de una manera débil en células de levadura (**Figura 11A**). La activación de SOS1 por parte de las MAPK es cuantitativamente menor a la producida por la fosforilación de SOS2 (**Figura 9B**), ya que la complementación de la cepa AXT5 con el alelo hiperactivo de MPK6-Y144C permitía el crecimiento de la levadura en 40 mM de NaCl, mientras que la complementación con la versión hiperactiva de SOS2-T168D/ $\Delta$ 308 sostenía crecimientos de la misma cepa a concentraciones de 200 mM. No obstante, el efecto tan drástico en la activación de SOS1 de la mutación de la serina 1136 a alanina (DAPS; **Figura 9B**), sumado al enmascaramiento de la actividad de MPK3 y MPK6 por parte de la MAPK endógena de *S. cerevisiae*, sugiere, aunque no demuestra formalmente, que la fosforilación de MPK6 y MPK3 sobre SOS1 es un requisito para la completa activación de SOS1 por SOS2. En resumen, la reconstitución del sistema SOS en la levadura indica que la serina-1136 está siendo fosforilada por una MAPK endógena que no ha podido ser identificada. Este evento no es suficiente para la activación de SOS1 ya que todavía es necesaria la fosforilación de la serina-1138 por SOS2 para la completa activación de SOS1 in vivo. Además, si se muta la serina 1136 se suprime la fosforilación por SOS2 y se pierde la capacidad de activación por ésta quinasa. Todo ello indica que la fosforilación de la serina-1136 es un requisito indispensable pero no suficiente para la activación de SOS1, lo que sólo ocurre tras la fosforilación por SOS2 en la serina-1138.

Sorprendentemente, la eliminación de la serina 1136 no suprimía la débil activación de SOS1 por MPK3 y MPK6-Y144C (**Figura 11B y C**), un resultado similar al obtenido al utilizar el par SOS2/SOS3 junto con las versiones DSPA y DAPA de SOS1 (**Figura 10**). El estudio de la activación de los alelos DAPS, DSPA y DAPA, nos muestra que, en levadura, la formación de complejos de proteínas en el C-terminal de SOS1 puede ayudar a desplazar el dominio autoinhibidor, incluso en ausencia de un sitio de

fosforilación. Este efecto de activación estérica, aunque predominante, parece estar muy influenciado por el estado de fosforilación de los aminoácidos diana y por la actividad quinasa de las enzimas activadoras. La presencia de un grupo fosfato natural o fosfomimético en el sitio 1136 (DSPA y DDPS, **Figura 9B**) parece inducir la unión de SOS2, mientras que el doble fosfomimético (DDPD, **Figura 9B**) parece favorecer la unión más eficiente de SOS2, tanto en presencia como en ausencia de SOS3. Además parece observarse un efecto positivo de la actividad de la proteína quinasa en cuando a su capacidad de interactuar con el C-terminal de SOS1, ya que tuvieron un efecto superior las proteínas recombinantes más activas (SOS2-T168D-Δ308, MPK6-Y144C, MPK3), que las proteínas silvestres menos activas (SOS2, MPK6). En este sentido, se ha demostrado que la fosforilación puede servir para estabilizar regiones de la estructura de la proteína diana con objeto de favorecer la interacción con proteínas reguladoras, cuya unión es la responsable última de la activación de la proteína diana. Estudios estructurales del antiportador NHE1 han mostrado que los aminoácidos fosforilables se localizan en regiones desordenadas del C-terminal. La función de la fosforilación de estos residuos es reestructurar la región, facilitando no solo la actividad intrínseca de la proteína, sino cualquier proceso biológico dependiente de estos dominios, como son la interacción proteína-proteína u otras modificaciones postraduccionales (329). Este estudio identifica una serie de motivos de fosforilación implicados en el ordenamiento de dominios intrínsecamente desordenados, entre los que se encuentra S-P-S-K, que coincide con la estructura del sitio de fosforilación doble  $_{1135}\text{DSPSK}_{1139}$  presente en SOS1. Este proceso permitiría explicar el descenso en la activación de SOS1 por SOS2 en ausencia de un sitio serina 1136 nativo. Otros estudios que muestran la relevancia de los sitios de fosforilación en este tipo de mecanismos de interacción/activación son los trabajos acerca de los complejos CIPK/CBL. La proteína quinasa CIPK24 interactúa con el sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  CBL10 y lo fosforila en la serina 237 (330). Mutantes de CBL10 no fosforilables en la posición 237 no pueden formar un complejo estable con CIPK24, reduciendo la eficacia del complejo CIPK/CBL10 para activar a SOS1.

Adicionalmente al posible efecto activador de la asociación de las proteínas MAPK al C-terminal de SOS1, no es descartable la posibilidad de que el aumento provocado en la actividad del antiportador pueda deberse a la fosforilación de algún

sitio alternativo diferente a la serina 1136. Como se observa en la **Figura 6B**, en el C-terminal de SOS1 existen múltiples sitios SP que podrían ser fosforilados por MAPKs, de los cuales el sitio Ser-1136 es el que presenta una puntuación más elevada como sitio previsible de fosforilación. Resultados no publicados del grupo del Dr. Dae-Jin Yun (Konkuk University, Corea del Sur) han mostrado que MPK3 puede fosforilar *in vitro* al C-terminal de SOS1 en los sitios serina-925, serina-930 y treonina-988. El alineamiento mediante el programa ClustalOmega (311) del C-terminal de distintas especies de SOS1 muestra que solo la serina-925 se encuentra conservada entre las distintas formas de SOS1, habiendo sido sustituida por una treonina seguida de una alanina en *Physcomitrella patens*, *Solanum lycopersicum* o *Oryza sativa*. La secuencia flanqueante de este dominio de fosforilación también se encuentra conservada entre las distintas formas de SOS1.

<i>Arabidopsis thaliana</i>	GFVKPVGIIKEE-LISS <b>P</b> --AAL <b>S</b> PSNGNQ-SFHN
<i>Theellungiella salsuginea</i>	GFIKAVGIQEEELIAS <b>P</b> --AAL <b>L</b> HSNENQ-SFRN
<i>Brassica napus</i>	GFIKPVGIIQEE-LVP <b>S</b> P--AAL <b>L</b> PYNENQ-SFRN
<i>Brachipodium sylvaticum</i>	GFIKPVGIIQEE-LIAS <b>P</b> --AAL <b>L</b> PSNGNQ-SFHN
<i>Cymodocea nodosa</i>	GFLKTQDAHKS-LIAS <b>P</b> --AV <b>L</b> <b>L</b> PSNVELSFLSL
<i>Chenopodium quinoa</i>	GFVKSHPLAEE-LIP <b>S</b> P--AAL <b>W</b> PAQGNS-SFLS
<i>Limonium gmelinii</i>	GFVKSHG-HE--LLI <b>T</b> PP-AAL <b>I</b> PPNPDL-ILRS
<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	GFIKCHSLHEE-LIT <b>S</b> P--AAL <b>W</b> PAQGNS-SFLS
<i>Oryza sativa</i>	GFLKTKN-QT--LI- <b>T</b> P-PGL <b>L</b> <b>L</b> PPNADLNLFGL
<i>Populus euphratica</i>	GFIKAHGFQDE-LIAS <b>P</b> --AV <b>L</b> <b>L</b> PPQGNQ-SFQK
<i>Physcomitrella patens</i>	GFVRQEN-STE-LIT <b>A</b> P--AG <b>L</b> <b>T</b> A---KI-LLPS
<i>Sorghum bicolor</i>	GFIKSHSLVEE-LIT <b>S</b> P--AP <b>L</b> <b>W</b> PAQGNA-SFLN
<i>Solanum lycopersicum</i>	GFVKSHGSHEG-LL <b>S</b> A <b>P</b> --AP <b>L</b> <b>L</b> PLALEQQSFHN
<i>Vitis vinifera</i>	GFIKGQ---EE-LIT <b>T</b> YP--AAL <b>M</b> PSHN-L-SFRS
<i>Zygophyllum xanthoxyum</i>	GFVR-SHGAQD-LIT <b>S</b> P--AG <b>L</b> <b>L</b> PLHEN---MS
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GADR---TLHRRPSS <b>L</b> <b>T</b> PPRSSSSD-QLQ
<i>Theellungiella salsuginea</i>	GAHR---TLQRKPST <b>L</b> ASPRATSSDHQLK
<i>Brassica napus</i>	GAHR---TLQRKPSS <b>L</b> <b>S</b> SQIGTSSEHQLQ
<i>Brachipodium sylvaticum</i>	GADR---TLHRRPSS <b>L</b> <b>T</b> PPRSSSSD-QLQ
<i>Cymodocea nodosa</i>	EPFS---PLQRRQSS <b>W</b> <b>M</b> SHS-----IEPQ
<i>Chenopodium quinoa</i>	QADN---TLLRKSS <b>L</b> <b>L</b> LH-----DQ-SS
<i>Limonium gmelinii</i>	EIDK---ALKRRQSS <b>I</b> <b>L</b> LQ-----KRDSA
<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	QHDK---TLMRRKSS <b>L</b> <b>L</b> LH-----DQ-ST
<i>Oryza sativa</i>	EIEA---DLQ-RSAS <b>L</b> <b>I</b> SQT-----LELP
<i>Populus euphratica</i>	EADG---ALRRGSS <b>S</b> <b>L</b> V-----LGDHPRH
<i>Physcomitrella patens</i>	QGSSQLLAVPRKTSR <b>S</b> <b>M</b> LR-----LSSK
<i>Sorghum bicolor</i>	QPES---TLQRRKSS <b>F</b> <b>L</b> L-----EQ-SA
<i>Solanum lycopersicum</i>	LSGR---GLQRRSS <b>S</b> <b>L</b> <b>L</b> SH---SIDHPSR
<i>Vitis vinifera</i>	EADR---GLQRRSS <b>S</b> <b>L</b> <b>V</b> PH---SADQPSR
<i>Zygophyllum xanthoxyum</i>	QADS---ALPGVSS <b>S</b> - <b>F</b> <b>T</b> H---AGDRAHK

**Fig. 33** Alineamiento de secuencias de distintas especies de los fragmentos del C-terminal de SOS1 donde se encuentran marcadas en negrita las serina-925 y 930 (superior) y la treonina-988 (inferior), fosforiladas *in vitro* por MPK3 en *A. thaliana*. Se puede comprobar que la serina-930 y la treonina-988 no se encuentran conservadas en el resto de ortólogos de SOS1, indicando una posible fosforilación artefactual en *A. thaliana*.

Es interesante remarcar que los resultados presentados por Yu et al. (2010)(141) mostraban que el fragmento compuesto por los aminoácidos 1048-1166 del C-terminal de SOS1 co-precipitaba con MPK6 y era fosforilado por esta quinasa *in vitro*, excluyendo por tanto la fosforilación del sitio Ser-925. Los ensayos de ese trabajo se realizaron con quinasa inmunoprecipitada de hojas de *Arabidopsis* tratadas con NaCl, por lo que puede hipotetizarse la existencia de distintas rutas señaladoras en la regulación por MAPK de SOS1, en las que la MAP2K implicada en la activación de MPK6 determine el sitio de fosforilación específico dentro de SOS1. Este tipo de mecanismo de determinación de la diana de la quinasa no existiría en la levadura, en la que se puede suponer una fosforilación más inespecífica de SOS1.

Nuestros experimentos de fosforilación *in vitro* del sitio DSPS con MPK3 y MPK6-Y144C confirmaron que ambas quinastas pueden fosforilar del sitio Ser-1136 específicamente, y que esta fosforilación no depende del estado de fosforilación del sitio Ser-1138 (**Figura 8**). Sin embargo, SOS2 no es capaz de fosforilar el sitio Ser-1138 en ausencia de la serina 1136, ni en presencia de un aminoácido fosfomimético en este sitio (**Figura 8C**). Si esta pérdida de la interacción se debe a una regulación negativa de la actividad de SOS1 por parte de las MAPK o simplemente a una distorsión artefactual del sitio de reconocimiento de SOS2 en condiciones *in vitro*, es una pregunta que queda por contestar con experimentos adicionales. La ausencia de inhibición en el ensayo de co-expresión de SOS1 con MPK6 y SOS2 en levadura (**Figuras 12A y B**) muestra que al menos no hay una interferencia entre la actividades de las MAPKs y SOS2, y que una regulación negativa de la fosforilación por SOS2 mediante la modificación de la Ser-1136 no es probable *in vivo*.

Nuestro estudio del fenotipo de los mutantes *mpk3* y *mpk6* de *Arabidopsis* ha mostrado que estos mutantes simples no son significativamente más sensibles al sodio que las plantas silvestres. Aunque el tratamiento con concentraciones muy bajas de NaCl (5 mM, 10 mM) permitía observar caídas en el peso de los mutantes *mpk6-2*, las diferencias en los pesos fresco y seco no eran significativamente menores que las medidas para Col-0 (**Figura 15B**). Del mismo modo, el efecto de la mutación *mpk6* o *mpk3* en un fondo *sos2* resultaba en unos rendimientos en el crecimiento menores, aunque las diferencias en el nivel de crecimiento en sal de un fondo *sos2* son difíciles

de observar, considerando el fenotipo extremo de estas plantas (**Figura 15B**). El estudio del efecto de un tratamiento salino sobre las tasas de germinación de diferentes mutantes *mpk6* y del mutante doble *mpk6 sos2*, mostró que los mutantes dobles eran más sensibles a la sal en este estadio del desarrollo, quedando bloqueada la planta tras la producción de la raíz. Los mutantes simples *sos2*, sin embargo, lograban desarrollar los cotiledones e incluso hojas verdaderas (**Figura 17**). Estos resultados sugieren claramente una función positiva de MPK6 en la actividad de SOS1.

Una posible explicación para este fenotipo de tolerancia a la salinidad de los mutantes simples *mpk3* y *mpk6* es la redundancia funcional entre ambas quinasas. Como se ha comentado en la Introducción, estas dos proteínas comparten múltiples rutas de señalización, en la que sus activadores y proteínas diana son las mismas. Es muy probable que la ausencia de cualquiera de estas proteínas pueda ser compensada con la otra. La búsqueda de dobles mutantes *mpk3 mpk6* ha resultado hasta el momento infructuosa, siendo estas plantas estériles e incapaces de progresar más allá de los pasos iniciales del desarrollo del embrión.

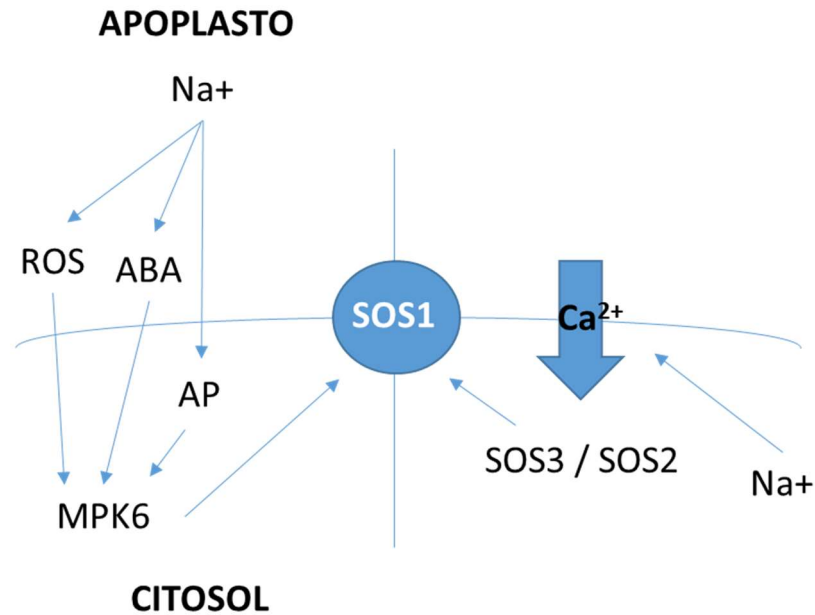
Es interesante indicar que existen discrepancias en la descripción del crecimiento de los mutantes *mpk6* en presencia de sal en la bibliografía. Mientras estudios como el de Yu et al. (141) muestran una reducción en el crecimiento de la raíz y en el peso seco de los mutantes *mpk6*, otros estudios (324, 325, 331), muestran como el fenotipo de los mutantes *mpk6* en presencia de sal es un aumento de la elongación de la raíz con respecto a las plantas silvestres. Esta diferencia en el fenotipo de los mutantes puede deberse a la naturaleza de los mismos. Mientras que en nuestro estudio y en los estudios (324, 325, 331) se observaba el fenotipo de mutantes por inserción de T-DNA tipo SALK, el estudio de Yu et al (141) se basaba en mutantes de RNAi, lo que puede suponer diferencias en los niveles de expresión y/o regulación de otras MAPKs con homología de secuencia con MPK6, como MPK3 y MPK4.

La naturaleza de esta diferencia en el fenotipo de los distintos mutantes *mpk6* es especialmente importante de dilucidar, ya que la función de la fosforilación de SOS1 por MPK6 no es evidente dentro del modelo de respuesta de la planta a la sal. El único fenotipo claro en la respuesta a la sal de los mutantes *mpk6* parece ser la pérdida de la

percepción del mecanismo de respuesta temprano a la salinidad, esto es, la desaparición del periodo de quiescencia del crecimiento radicular dependiente de sal (131).

En los artículos de Han et al. de 2014 y 2015 (324, 325) se propone el papel señalizador de MPK6 en el control de la elongación de la raíz en presencia de sodio. MPK6 parece modular el influjo neto de  $\text{Na}^+$  al interior celular (vía control de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ ) y la actividad peroxidasa en la membrana y el apoplasto; ambos procesos están fuertemente relacionados con el control del crecimiento en situaciones de estrés osmótico/salino. La fase de quiescencia inicial del proceso de adaptación al estrés salino, se produce mediante la inducción de una pérdida del potencial osmótico de la célula, un aumento en la producción de ROS mediada por la activación de las peroxidasas extracelulares, producción de ácido fosfatídico mediado por PLDs y un incremento de los niveles de ABA que inhiben la división y la expansión celular (131). Existen evidencias que relacionan la activación de SOS1 con una respuesta a la producción de ROS. Concretamente, el mutante *sos1-1* es hipersensible a la producción o presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el apoplasto y se ha observado que RCD1, una ADP-ribosiltransferasa importante en la transducción de la señalización por ROS mediada por hormonas (ABA, etileno y ácido jasmónico) en procesos de respuesta a estrés y desarrollo (332), interacciona con el C-terminal de SOS1 en presencia de estrés salino o tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (333).

Las evidencias de una red de señalización apoplástica que engloba todos los activadores aguas arriba de MPK6, junto a la desaparición de la fase de quiescencia en respuesta a sal del mutante *mpk6* podrían indicar un papel de las MAPK en la respuesta al componente osmótico del estrés salino. Este proceso no está asociado a la acumulación de sodio citoplasmático (131), sino que se inicia mediante señalización del estrés osmótico e hídrico desde el apoplasto, por lo que un papel de activación de SOS1 independiente de o aditiva con SOS2 encajaría en este modelo. Es interesante destacar en este sentido que en la caracterización inicial de los mutantes de *SOS1* por Zhu (271), *SOS1* es el único locus de la ruta SOS que muestra sensibilidad al estrés osmótico, indicando que SOS2 no está implicado en esta activación de SOS1 por estrés osmótico (**Figura 34**).



**Fig. 34 Representación esquemática de un posible papel secuencial en la activación de SOS1 en las distintas fases del estrés salino.** Inicialmente, la presencia de sodio en el apoplasto induciría los procesos de señalización osmótica e hídrica, con la consecuente acumulación de ROS en el apoplasto, producción y transporte de ABA en la raíz y la producción de AP en el interior celular. Todos estos procesos convergerían en distintos nodos de señalización intracelular, siendo uno de ellos MPK6, que fosforilaría a SOS1. Posteriormente, la acumulación de sodio en el interior del citoplasma, induciría la liberación de calcio al citoplasma, lo que induciría la activación de SOS2/SOS3.

Este mecanismo, que es coherente con nuestro modelo mecanístico de activación doble de SOS1 por MAPKs y SOS2/SOS3, es consecuente con el papel de HOG1, la MAPK homóloga de MPK3 y MPK6 en *S. cerevisiae*. HOG1 posee un doble papel en la tolerancia al estrés salino en la levadura: en los estadios iniciales del estrés permite una detoxificación del sodio mediante la activación del antiportador de membrana plasmática NHA1. Posteriormente, HOG1 migra al núcleo, donde activa la transcripción de genes de tolerancia a la salinidad (334). Este mecanismo permitiría la tolerancia temprana/osmótica a la salinidad, produciendo una respuesta de bombeo de sodio limitada que permite la adaptación temprana de la levadura, y la activación de mecanismos posteriores, genéticos y proteómicos (expresión de genes *ENA*, activación de transportadores de potasio). En *Arabidopsis*, MPK6 está implicada en la regulación de factores de transcripción de respuesta a sal. Por ejemplo, ZAT10 es inducido por fosforilación de MPK6 en 30 minutos después del tratamiento con  $H_2O_2$ ,



implicando una migración de la actividad quinasa de MPK6 al núcleo en estadios posteriores de la respuesta a estrés (184).

A la vista de los resultados obtenidos, MPK6 y MPK3 parecen regular la actividad de SOS1 mediante la fosforilación del sitio 1136 y, quizás también a través de su interacción con el C-terminal del antiportador. El efecto de esta fosforilación es un aumento en la actividad de SOS1. Aunque esta fosforilación no depende de la actividad del resto de componentes de la ruta SOS, la activación conjunta de las rutas SOS y MAPK parece aumentar la actividad del antiportador por encima de las activaciones individuales. La fosforilación de SOS1 por parte de MPK6/MPK3 podría tener un papel en la respuesta a ROS y AP producidos en los estadios tempranos del estrés salino, debidos a la presencia de sales en el apoplasto y el consiguiente estrés osmótico.

#### Regulación de SOS2 por GRIK

El estudio detallado del fenotipo del doble mutante *grik1 grik2* ha permitido determinar la relación de estas proteínas con la tolerancia al estrés salino. Los estudios anteriores del mutante doble *grik1 grik2* describían este genotipo como no viable, ya que el mutante no era capaz de progresar tras la fase de cotiledón (335, 336). Los mutantes *grik* estudiados previamente utilizaban el cruce de los alelos *grik1-1 grik2-1*, correspondiente a las líneas de inserción GABI 713C09 para *grik1* y Salk\_105230 para *grik2*. El cruce utilizado en este estudio parte de la línea *grik1-2* (Salk\_142938), siendo la principal diferencia entre estas dos accesiones la localización del trasposón dentro del locus *GRIK1* (octavo intrón en la línea GABI, primer intrón en la línea SALK utilizada en este estudio). Es posible, por tanto, que los mutantes utilizados en este estudio produzcan una versión truncada de GRIK1 con niveles de actividad suficientes para la supervivencia del mutante. Ensayos no presentes en esta memoria muestran que la proteína SnRK1, que es un sustrato reconocido de las proteínas GRIK, se encuentra parcialmente fosforilada en el fondo *grik1-2 grik2-1*, apoyando esta posibilidad (Juan D. Barajaz-López, José R. Moreno, et al., 2017; en revisión).

El mutante *grik1-2 grik2-1* muestra sensibilidad a concentraciones elevadas de sodio, lo que nos indica un papel adicional al ya descrito como regulador de las proteínas SnRK1. Para determinar el efecto de las proteínas GRIK sobre SOS2, hemos recurrido a ensayos de fosforilación in vitro, donde pudimos observar que existe una actividad directa de GRIK1 sobre SOS2. GRIK2, sin embargo, no posee una actividad quinasa detectable sobre SOS2. Ensayos adicionales, utilizando como sustrato las versiones mutantes en los residuos fosforilables del *T-loop* de SOS2, nos indicaron que la eliminación de la treonina-168 suprimía la reacción de fosforilación, sugiriendo que la treonina-168 es el residuo específico que fosforila GRIK1, activando a SOS2. Este resultado es coherente con el hallazgo de que la mutación fosfomimética T168D produce una proteína SOS2 con mayor actividad in vitro (231).

El estudio de la secuencia del *T-loop* entre el resto de proteínas SnRK nos muestra que el sitio treonina 168 se encuentra conservado entre todas las SnRK3, pero no en las SnRK2, donde podemos encontrar una serina (**Figura 35**) , indicando una posible regulación conservada de toda la familia SnRK3 por parte de GRIK1.

Otros residuos fosforilables en el *T-loop*, como la serina 155, también parece conservada entre todos los miembros de las familias SnRK2 y SnRK3, mientras que la tirosina 175 está ausente en CIPK17/SnRK3.21 y CIPK21/SnRK3.2, sugiriendo que la conservación de estos sitios es importante para la arquitectura y regulación del dominio.

SOS2/CIPK24/SnRK3.11  
SRK2J/SnRK2.9  
SRK2A/SnRK2.4  
SRK2B/SnRK2.10  
SRK2G/SnRK2.1  
SRK2H/SnRK2.5  
SRK2F/SnRK2.7  
SRK2C/SnRK2.8  
OST1/SRK2E/SnRK2.6  
SRK2D/SnRK2.2  
SRK2I/SnRK2.3  
CIPK4/SnRK3.3/PKS9  
CIPK7/SnRK3.10/PKS7  
CIPK16/SnRK3.18/PKS15  
CIPK5/SnRK3.24/PKS19  
CIPK25/SnRK3.25/PKS25  
CIPK12/SnRK3.9/PKS8  
CIPK19/SnRK3.5/PKS21  
CIPK13/SnRK3.7/PKS10  
CIPK18/SnRK3.20/PKS22  
CIPK6/SnRK3.14/PKS4  
CIPK20/SnRK3.6/PKS18  
CIPK15/SnRK3.1/PKS3  
CIPK2/SnRK3.2/PKS16  
CIPK10/SnRK3.8/PKS2  
CIPK22/SnRK3.19/PKS14  
CIPK11/SnRK3.22/PKS5  
CIPK14/SnRK3.15/PKS24  
CIPK21/SnRK3.2/PKS23  
CIPK1/SnRK3.16/PKS13  
CIPK17/SnRK3.21/PKS20  
CIPK3/SnRK3.17/PKS12  
CIPK26/SnRK3.26/PKS26  
CIPK9/SnRK3.12/PKS6  
CIPK23/SnRK3.23/PKS17  
CIPK6/SnRK3.13/PKS11

LLDTN--GNLKVSDFGLSALPQE-----GVELLRTTCGTPNYVAPEVLSGGQYDGSA  
LLDGSFPAPRLKICDFGYSKSSVL-----HSNPKSTVGTPAYIAPEVFCRSEYDGKS  
LLDGSFPAPRLKICDFGYSKSSL-----HSRPKSTVGTPAYIAPEVLSRREYDGKM  
LLDGSFPAPRLKICDFGYSKSSL-----HSMPKSTVGTPAYIAPEVLSRGEYDGKM  
LLDGSFPAPLLKICDFGYSKSSIL-----HSRPKSTVGTPAYIAPEVLSRREYDGKH  
LLDGSFPAPLLKICDFGYSKSSL-----HSRPKSTVGTPAYIAPEVLSRREYDGKH  
LLDGSFSSHLLKICDFGYSKSSVL-----HSQPKSTVGTPAYIAPEVLSRKEYNGK  
LLDGSFAPRVKICDFGYSKSGVL-----HSQPKTTVGTPAYIAPEVLSRTEYDGKI  
LLDGSFPAPRLKICDFGYSKSSVL-----HSQPKSTVGTPAYIAPEVLLKKEYYDGKV  
LLDGSFPAPRLKICDFGYSKSSVL-----HSQPKSTVGTPAYIAPEILLRQEYDGKL  
LLDGSFPAPRLKICDFGYSKSSVL-----HSQPKSTVGTPAYIAPEVLLRQEYDGKI  
LLDKQ--GNLKVSDFGLSALPEH-----RSNGLLHTACGTPAYTAPEVIAQRGYDGAK  
LLDEQ--GNLKVSDFGLSALPEH-----L-QNGLLHTACGTPAYTAPEVISRRGYDGAK  
LLDGE--GDLKVTDFGLSALMMPEGLGRRGSSDDLHLTRCGTPAYVAPEVLRNKGYDGAM  
LLDEN--GDLKISDFGLSALPEQ-----ILQDGLLHTQCCTPAYVAPEVLKKKG YDGAK  
LVDEN--GDLKVSDFGLSALPEQ-----ILQDGLLHTQCCTPAYVAPEVLRKKGYDGAK  
LLDEN--GNLKVSDFGLSAVSDQ-----IRQDGLFHFTFCGTPAYVAPEVLARKGYDAAK  
LLDEN--GNLKVSDFGLSAVSDQ-----IRQDGLFHFTFCGTPAYVAPEVLARKGYDGA  
LLDDK--GNVKVSDFGLSVVSEQ-----LKQEGICQTCCGTPAYLAPEVLTRKGYEGAK  
LLDNK--GNLKVSDFGLSAVAEQ-----LRQDGLCHTFCTGTPAYIAPEVLRKGYDAAK  
LLDEE--GNLKVTDFGLSAFTEH-----LKQDGLLHTTCGTPAYVAPEVILKKGYDGAK  
LLDEN--GDLKISDFGLSALRES-----KQQDGLLHTTCGTPAYVAPEVI GKKG YDGAK  
LLDEH--GNLKISDFGLSALS DS-----RRQDGLLHTTCGTPAYVAPEVISRNGYDGFK  
LLDDN--DNLKVSDFGLSALADC-----KRQDGLLHTTCGTPAYVAPEVINRKG YEGTK  
LLDDN--ENLKVSDFGLSALADC-----KRQDGLLHTTCGTPAYVAPEVINRKG YDGTK  
LLDEN--RDLKVSDFGLSAMKEQ-----IHPDGLMLHTLCGTPAYVAPELLKKGYDGSK  
LIDEN--GNLKVSDFGLSALT DQ-----IRPDGLLHTLCGTPAYVAPEILLSKKGYEGAK  
LLDEK--LDLKISDFGLSALT DQ-----IRPDGLLHTLCGTPAYVAPEVLAKKYDGAK  
LLDSK--GNLKVSDFGLSAVPKS-----GDMLSACGSPCYAPELIMNKYS GAA  
LLDAK--GHIKITDFGLSALPQH-----FRDDGLLHTTTCGSPNYVAPEVLANRGYDGA  
LLDAK--GHIKITDFGLSALS QH-----YREDGLLHTCSGPNYVAPEVLNDGYDGAAS  
LLDSY--GNLKISDFGLSALS QQ-----VRDDGLLHTSCGTPNYVAPEVLNDRGYDGAT  
LLDAQ--GNLKVSDFGLSALS RQ-----VRGDGLLHTACGTPNYAPEVLNDQYDYGAT  
ILDAN--GVLKVSDFGLSAFSRQ-----VREDGLLHTACGTPNYVAPEVLSDKGYDGAA  
LLDAN--GALKVSDFGLSALPQQ-----VREDGLLHTTCGTPNYVAPEVINNKGYDGAK  
LLDSQ--GNLKISDFGLSALPEQ-----GVTILKTTCGTPNYVAPEVLSHKYNGAV

:: \* : \* \* \*

: \* \* \* \* :

Para determinar un posible efecto de GRIK sobre la actividad de SOS1 reconstruimos la ruta de señalización GRIK-SOS2-SOS1 tanto *in vitro* como en células de levadura. El experimento de fosforilación *in vitro* de la versión mutante de SOS2-Δ308, carente de dominio autoinhibidor C-terminal, nos muestra que la fosforilación del residuo treonina 168 es necesaria y suficiente para la activación de SOS2, y que esa activación induce la fosforilación de SOS1 (**Figura 22**). Este resultado se complementa con la reconstitución de la ruta GRIK/SOS en levadura: la mutación de las tres quinasas activadoras de SNF1 (ELM1, SAK1, TOS3), elimina completamente la actividad de SOS2 *in vivo*, haciendo imposible la activación de SOS1 bajo un tratamiento de salinidad (**Figura 23**). La complementación con GRIK1 de la estirpe Δ3K4 (Δelm1 Δsak1 Δtos3 Δena1-4) restituye el crecimiento en sal, indicando una reactivación de la ruta SOS2 mediada por la interacción con GRIK1 (**Figura 23**). Adicionalmente, el estudio de la

interacción de GRIK1 y SOS2 mediante BIFC determinó que esta interacción se producía también *in planta*, y situó el complejo en el citoplasma de *N. benthamiana* y *S. cerevisiae* (**Figuras 24A y B**), accesible por tanto para la activación de SOS1 en la membrana plasmática.

El estudio del efecto en *Arabidopsis* de las mutaciones en el *T-loop* de SOS2 nos muestra que la sustitución de la treonina-168 por un aminoácido no fosforilable impide la complementación génica y produce un fenotipo en la planta similar al de la mutación *sos2* (**Figura 18**). La mutación de los residuos serina 159 y tirosina 175 también producen un efecto negativo en la tolerancia de la planta a la sal pero, sin embargo, no son esenciales para la supervivencia de la misma (**Figura 18**). El papel de los residuos serina 159 y tirosina 175 podría estar relacionado con una modificación de la conformación del dominio quinasa catalítico de SOS2 (193) o con una regulación adicional de la actividad quinasa de SOS2 mediada por otras rutas de señalización, pero no por GRK1 ya que esta quinasa no fosforila ninguno de estos residuos *in vitro*. Esto podría explicar, por ejemplo, la diferencias en sensibilidad entre el mutante doble *grik1-2 grik2-1* y el mutante *sos2* (**Figura 25**), pudiendo existir señales adicionales que modularan de la actividad de SOS2 en respuesta a otros estímulos.

### Regulación de SOS2 por GSO1

La regulación de la actividad de SOS2 por GSO1 (también conocido como SCHENGEN 3, SGN3) supone la interacción directa de una ruta implicada en el desarrollo, identidad y estructura de tipos celulares de la raíz y la ruta de respuesta al estrés salino.

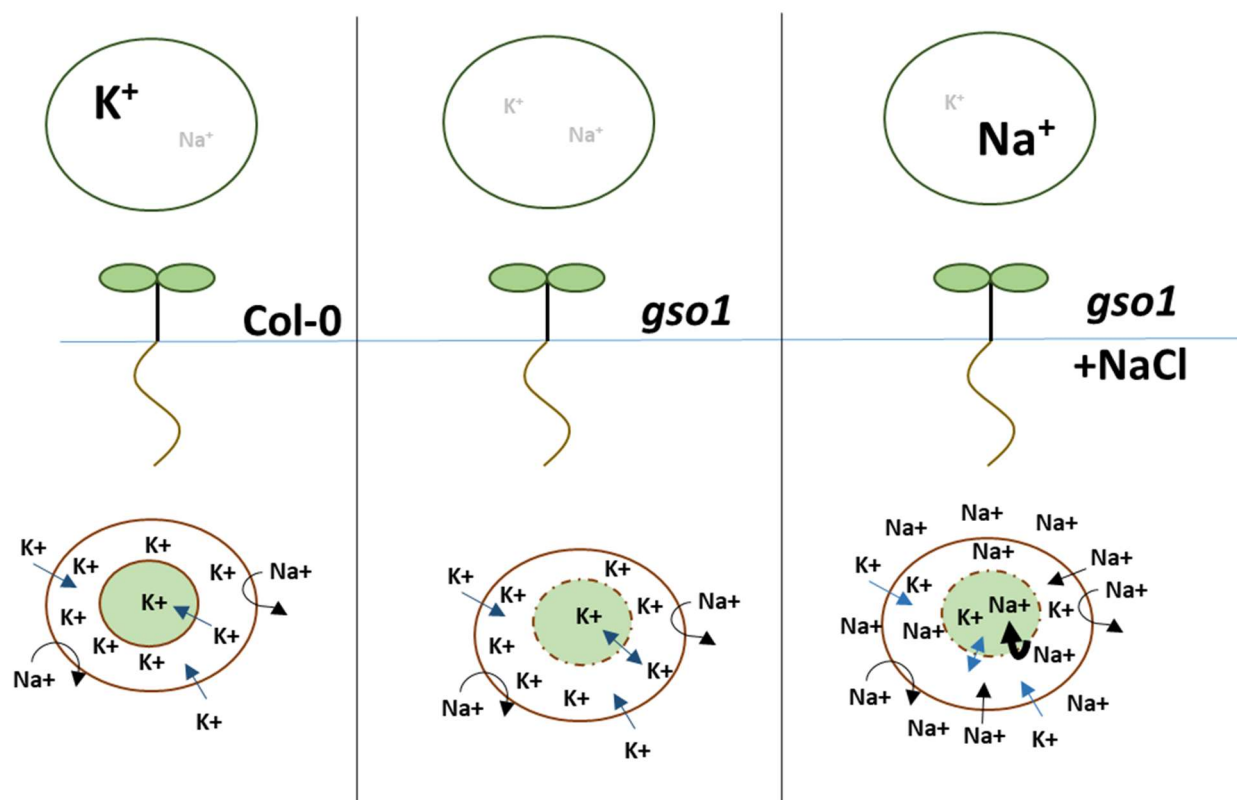
El estudio del crecimiento en sal de los mutantes *gso1* mostró un efecto negativo del sodio en su crecimiento, además de una distribución anómala de los contenidos de sodio en la planta, que se acumula en su parte aérea. Del mismo modo, los mutantes *gso1* parecen presentar una disminución en los niveles de potasio tanto en la raíz como en la parte aérea. Este resultado es congruente con los obtenidos en

otros estudios del mutante *gso1/sgn3*, que presenta un fenotipo de pérdida de potasio y una sobreexpresión de los genes *AKT1* y *HAK5* (262).

En este trabajo hemos determinado que SOS2 podría estar regulado negativamente por GSO1 ya que la co-expresión de SOS2 y GSO1 en levaduras reduce la actividad de SOS1 mediada por SOS2 (**Figura 28**). Esta inhibición de SOS1 es consistente con experimentos de fosforilación *in vitro*, en los que se observa que la actividad quinasa de SOS2 sobre SOS1 desaparece en presencia de GSO1, y que esa reducción de la actividad está mediada por la fosforilación de SOS2 por el dominio quinasa de GSO1 (**Figura 32A**). Adicionalmente, mediante BIFC, hemos observado una interacción física estable *in vivo* entre el dominio quinasa de GSO1 y SOS2 (**Figura 30**). El estudio de la regulación de HKT1 por GSO1 mostró, sin embargo, que la LRR-RK no produce ningún efecto sobre la actividad del transportador en levadura, ni puede observarse interacción entre GSO1 y HKT1 mediante BiFC, sugiriendo que no existe una regulación de HKT1 por GSO1. Estudios no publicados del Dr. Dae-Jin Yun (Konkuk University) implican a SOS3 en la regulación negativa de HKT1, por lo que también probamos un posible efecto de SOS2 y SOS3 mediado por GSO1 en la regulación de HKT1. En este caso tampoco se observó ningún fenotipo evidente en la levadura, lo que sugiere que GSO1 no produce ningún efecto directo ni indirecto en la regulación de HKT1, al menos en nuestro modelo de reconstitución de vías de señalización de *S. cerevisiae*.

El papel de GSO1 en el control del flujo iónico en la raíz no es evidente. La ruptura de la continuidad de la banda de Caspari en el mutante *gso1/sgn3* parece provocar la pérdida del filtro de selectividad impuesto por la endodermis de la raíz y la distribución anómala de los contenidos iónicos de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>. Comparando nuestros resultados de contenidos iónicos (**Figura 27**), con los de otros estudios del mutante *gso1/sgn3* (262), podemos observar que el Na<sup>+</sup> y el K<sup>+</sup> presentan procesos de acumulación diferenciales en el mutante *gso1*. Mientras que el K<sup>+</sup> queda excluido de la parte aérea, el Na<sup>+</sup> parece distribuirse de manera similar en el mutante *gso1* y en Col-0. Sin embargo, la aplicación de un tratamiento salino sobre *gso1* produce una acumulación del Na<sup>+</sup> en la parte aérea de la planta (**Figura 27**). El K<sup>+</sup> es el ión más móvil de todos los nutrientes minerales, ya que a su gran permeabilidad en membranas

celulares se une el hecho de que no es metabolizable o convertible en materia orgánica, como ocurre con otros nutrientes minerales como nitrato, sulfato y fosfato. Los flujos de  $K^+$  además son muy dinámicos, con rápidos flujos de entrada y salida para controlar el ajuste osmótico celular y el potencial de membrana. Por tanto, la ausencia de una endodermis funcional por la pérdida de la banda de Caspari podría significar la incapacidad de la raíz para mantener un contenido de  $K^+$  adecuado y la consiguiente exportación al tallo. La acumulación de  $Na^+$  en tallos y en raíces del mutante *gso1/sgn3* podría deberse igualmente a la pérdida del filtro de selectividad en la endodermis, permitiendo la entrada de  $Na^+$  en la estela y su distribución a la parte aérea como consecuencia de la evatranspiración y transporte xilemático. En los mutantes *gso1* crecidos en un condiciones normales, el sodio quedaría excluido de la raíz normalmente, mientras que la falta de barrera endodérmica impediría la distribución normal de potasio. Al aplicar un tratamiento salino a las plantas *gso1* se produciría una fase inicial en la acumulación de  $Na^+$  en los tejidos de la parte aerea, que terminaría provocando toxicidad, que no podría ser aliviada mediante la recirculación a la raíz, debido a la fuerte barrera osmótica y eléctrica producida por la acumulación de cationes en la endodermis (**Figura 36**).



**Fig. 36 Esquema de la acumulación de sodio y potasio en el mutante *gso1*.** Representación esquemática de los tejidos aéreos (superior) y subterráneos de la planta (inferiores). La circunferencia verde representa la endodermis y la estela de la raíz. Las discontinuidades en la banda de Caspari en el mutante *gso1* impiden la retención de  $K^+$  debido a la reversibilidad de los flujos de  $K^+$  en condiciones normales de crecimiento. La presencia de sal en el exterior podría provocar una primera fase de absorción de sodio, facilitada por la ausencia de un filtro selectivo en la endodermis, lo que provocaría la acumulación del mismo en la parte aérea.

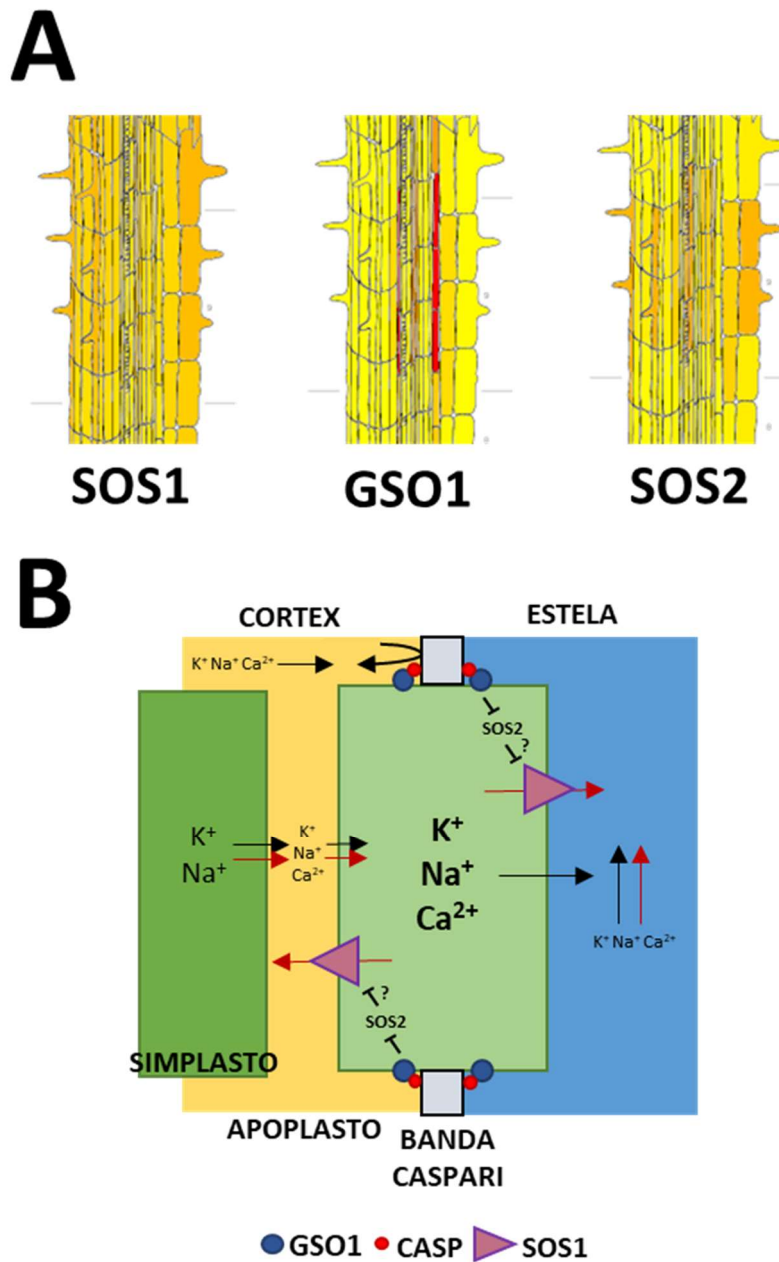
En Pfister et al. 2014 (262) se describe también el comportamiento de otros cationes de libre distribución por la raíz como el magnesio o el calcio. En el caso del calcio, los autores describen que el flujo de  $Ca^{2+}$  resulta invariable en los mutantes *gso1* y explican este comportamiento indicando que el flujo de calcio a través de la raíz se produce fundamentalmente a través del apoplasto, debido a su papel señalizador en el interior celular. Este comportamiento podría ser particularmente importante en la regulación de SOS2: la endodermis supone el único punto de la raíz en el que el  $Ca^{2+}$  presenta un obligado paso simplástico, lo que implica que los mecanismos de control del catión y de las proteínas que están reguladas por él deben ser especialmente eficientes en esta capa celular. Clarkson, en su trabajo de 1984 (265), sugiere un papel en este proceso de agentes quelantes del catión, o de su secuestro mediante unión a

proteínas, reduciendo los niveles de calcio libre en el citoplasma. En ese sentido, la actividad de GSO1 como regulador negativo de SOS2 en la membrana plasmática de la endodermis, podría servir como medida de control de una activación provocada por el paso intracelular de flujo de calcio.

Es importante considerar que la fosforilación de SOS1 in vitro o la extrusión de sodio en levadura no son más que indicadores de la actividad de SOS2, por lo que no son evidencias suficientes para determinar una correlación relevante entre GSO1 y SOS1 en el contexto de *Arabidopsis*. Una supresión de la inhibición de SOS2 podría inducir la actividad de SOS1, favoreciendo el bombeo *desregulado* de sodio a la parte aérea y explicando así el fenotipo de sensibilidad y la acumulación de sodio en las hojas. Sin embargo, la distribución conocida de GSO1 y SOS1 no permite establecer un modelo coherente que relacione a las tres proteínas.

Los patrones de expresión de *SOS1* y *GSO1* nos muestran que ambas proteínas solo se encontrarían co-expresadas en el anillo de la endodermis (**Figura 37**), sugiriendo que la regulación de la actividad de SOS1 mediada por GSO1 solo se daría en este tejido. El control de los niveles de sodio, calcio, ROS y pH en la membrana y el apoplasto son fundamentales para los procesos de desarrollo y arquitectura de la pared celular en general y la banda de Caspari en particular, por lo que el antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  puede requerir un nivel adicional de regulación en las estructuras en las que GSO1 está presente, regulando la actividad de las proteínas SOS (**Figura 37B**). Es por tanto fundamental determinar la posible cohabitación en la raíz de ambas proteínas, además del efecto de la mutación *gso1* en la distribución de SOS1, ya que una de las funciones de GSO1 es determinar la identidad del tipo celular en el que se expresa (337), pudiendo regular por tanto los niveles de expresión, traducción y localización subcelular de SOS1.





**Fig. 37 Interacción en *Arabidopsis* de las proteínas SOS1, SOS2 y GSO1.** (A) Patrón de expresión de *SOS1*, *GSO1* y *SOS2* en la zona de maduración de la raíz de *A. thaliana* (185). La tonalidad de rojo indica una mayor expresión absoluta del mensajero. El amarillo representa ausencia de expresión. (B) Modelo del flujo iónico y actividad de proteínas en la endodermis. La presencia de GSO1 en la membrana plasmática de las células de la endodermis, facilitarían la formación, en el exterior de la misma, de complejos de proteínas CASP, encargados de reclutar las enzimas encargadas de la iniciación y maduración de la banda de Caspari. El dominio quinasa intracelular de GSO1 estaría implicado en procesos de señalización intracelular y en la regulación de proteínas citoplasmáticas y/o de membrana, como SOS2. Las flechas negras representan la circulación general de iones y las rojas se refieren exclusivamente al sodio, suponiendo la presencia de SOS1 en ambas membranas de la endodermis. La inhibición de SOS2 resultaría en un bloqueo bidireccional del sodio.

Los últimos estudios realizados sobre GSO1 han permitido describir su regulación mediante la unión a ligandos extracelulares (proteínas CIF). Estos péptidos son producidos en los tejidos vasculares, induciendo mediante su unión a GSO1 los procesos de señalización intracelular que desembocan en la maduración de la banda de Caspari y en la suberización extracelular de la estructura (262, 338). Este proceso está regulado por la separación física entre el apoplasto del cortex y la estela, donde se liberan los ligandos de GSO1, de modo que la aparición de la banda de Caspari impide la activación de GSO1 mediante la exclusión de su ligando (338). Este mecanismo regulatorio se ve a su vez modificado por señales hormonales derivadas de estreses nutricionales y ambientales, fundamentalmente ABA y etileno, que funcionarían respectivamente como inductor y represor de la suberización (339). Como hemos mencionado previamente, la señalización por ABA y etileno en respuesta al estrés salino son inductoras de la actividad de SOS2, MPK3 y MPK6. Además, la modificación en la composición y permeabilidad de las paredes celulares de los tejidos circundantes de los haces vasculares de la estela han sido descritos previamente como una respuesta de la planta al estrés salino en algunas especies vegetales (340). Es por ello probable que exista una comunicación directa entre las rutas de señalización y respuesta al estrés salino y las proteínas encargadas de la arquitectura y composición de los tejidos de la raíz.

### Respuesta General

El estudio de la regulación de SOS1 y SOS2 por las rutas GRIK, MAPK y GSO, ha permitido establecer un nexo de unión entre la respuesta adaptativa de *Arabidopsis* a la salinidad y otras vías de señalización implicadas en el desarrollo y arquitectura de la raíz o el metabolismo de los azúcares.

La interacción entre la ruta MAPK y SOS1 indica que el C-terminal del antiportador es un elemento regulador de su actividad que permite integrar diversas señales, modulando su actividad dependiendo de las necesidades de la planta. Aunque se desconoce el papel de MPK6 y MPK3 en la activación de SOS1, es posible su relación

con la respuesta celular temprana al componente osmótico del estrés salino por analogía con la ruta HOG1-NHA1 de *S. cerevisiae* o en respuesta a la señalización ROS como se ha sugerido en animales y plantas. De igual modo, la interacción de la ruta MAPK con SOS1 abre un abanico de posibilidades regulatorias en otros procesos celulares, en los que ambas proteínas están implicadas, como la regulación del citoesqueleto, o en tráfico intracelular de vesículas.

La regulación aguas arriba de SOS2, y posiblemente de otras proteínas de la familia SnRK3, por parte de GRIK1, implica una interacción directa entre los mecanismos de regulación del consumo energético y los de tolerancia a la salinidad. Esta interacción, como se ha visto en la Introducción, es común en otros organismos y tiene sentido especialmente en los tejidos no fotosintéticos de la planta, en los que el control eficiente de los balances energéticos es fundamental para el correcto funcionamiento de los procesos de crecimiento y desarrollo del tejido, cuya función principal es ser fuente de nutrientes minerales para la parte aérea. Es interesante indicar que mientras que la presencia de alta glucosa en el medio tiene un efecto negativo en el crecimiento del mutante *grik1 grik2* (336), la presencia de azúcares en el medio de cultivo suprime el fenotipo de desarrollo cuticular del mutante *gso1* (261). Los efectos de los metabolitos del azúcar en el desarrollo de la planta se escapan de los objetivos de este trabajo, pero la ocurrencia de dos fenotipos antagónicos en dos de los reguladores positivos y negativos de SOS2 podría implicar un papel de la CIPK en la gestión de los recursos energéticos en presencia de estrés o un papel relevante de los niveles energéticos en la respuesta al estrés de células y tejidos.

Pueden encontrarse en la bibliografía otros resultados que sugieren esta interfaz reguladora en la que convergen las rutas catabólicas y las de respuesta ambiental. SOS2 está implicado en la regulación mediante fosforilación de EIN3 (341). Este factor de transcripción, implicado en la respuesta de los tejidos al etileno, también se encuentra regulado por MPK6 y MPK3. Así, los activadores conocidos de SOS1 estarían implicados también en la respuesta al etileno en la raíz. El etileno provoca disminuciones en la elongación de la raíz, modificación de su dirección de crecimiento, favore el transporte de metabolitos a raíces secundarias, y regula procesos de muerte celular programada.

El estudio fosfoproteómico del mutante dominante negativo SnRK1.1-K48M mostró un descenso en los niveles de fosforilación de MPK6 al aplicar a las plantas tratamientos de estrés energético por sumersión (342), lo que sugiere un nexo de comunicación adicional entre el estrés energético y la tolerancia a los estreses ambientales.

De igual modo, el control de otros elementos nutricionales en la raíz se encuentra también regulado por los niveles de azúcares. El tratamiento de *Arabidopsis* con azúcares induce la expresión de múltiples transportadores de  $\text{NO}_3^-$  (NRT1.1 y NRT2.1),  $\text{NH}_4^+$  (familia AMT), Pi (familia PHT),  $\text{SO}_4^{2-}$  (familia SULTR) y  $\text{K}^+$  (HAK5). La expresión de estos genes está regulada por diferentes rutas, incluyendo la Hexokinasa1 (en cuya regulación están implicadas MPK3/MPK6 y EIN3) o la ruta de oxidación de las pentosas fosfato (343, 344). Esto sugiere una integración entre el control de los contenidos iónicos de la raíz y el estado nutricional de la planta, incluyendo la actividad fotosintética de la parte aérea y los niveles de sacarosa (344). La proteína HAK5, que está regulada por CIPK23 (222), se encuentra sobreexpresada en los mutantes *gso1*, que presentan un fenotipo de hambre de potasio en condiciones de crecimiento normales (262). De igual modo la expresión de *HAK5* se encuentra inducida fuertemente en la oscuridad por sacarosa (343), lo que sugiere una implicación de la familia SnRK1 en la regulación de su expresión (345). La regulación nutricional del potasio es especialmente relevante pues, como se ha comentado previamente, los niveles de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  son el indicador esencial de la tolerancia de las plantas del estrés salino.

En conjunto, la regulación de los niveles de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en la raíz, modulada por proteínas, hormonas y mensajeros secundarios implicados en los procesos de metabolismo y desarrollo, indican una comunicación compleja entre los miembros de la ruta SOS y estos procesos, lo que exige una modulación muy precisa de estas proteínas que integran múltiples señales en la respuesta adaptativa a la salinidad.



## Conclusiones

1. MPK3 y MPK6 fosforilan a SOS1 en la serina 1136 de su extremo C-terminal, y esta fosforilación es necesaria para la actividad del antiportador in vivo.
2. La fosforilación de la serina 1136 por MPK3 y MPK6, situada junto al sitio de acción de SOS2 en la serina 1138, parece un requisito para la activación de SOS1 por SOS2.
2. Los mutantes *mpk3* y *mpk6* de *Arabidopsis thaliana* no presentan defectos en la tolerancia a la salinidad, indicando una posible redundancia funcional de ambas quinasas en la respuesta a este estrés. El doble mutante *sos2 mpk6* sí presenta una sensibilidad a la salinidad superior a los mutantes simples en estadíos tempranos del desarrollo.
3. GRIK1 fosforila a SOS2 en la treonina 168 situada dentro de su lazo de activación, siendo esta modificación fundamental para inducir la actividad quinasa de SOS2.
4. El mutante doble *grik1 grik2* presenta una sensibilidad a la presencia de sodio que es inferior a la del mutante *sos2*, por lo que deben existir vías alternativas de activación de SOS2 en la respuesta al estrés salino.
5. GSO1 fosforila a SOS2, regulando negativamente su actividad. La fosforilación de SOS2 por GSO1 puede inducir un descenso de la actividad de SOS1 en levadura.
6. GSO1 no tiene un papel regulador directo sobre HKT1. La regulación de SOS2 por GSO1 no afecta a la actividad de HKT1.



## Anexos

### Anexo 1. Abreviaturas

ABA	Ácido abcísico
AcNa	Acetato de sodio
AD	Dominio activación
AP	Medio arginina fosfato
ATP	Adenosín trifosfato
BD	Binding domain / Dominio de unión
BiFC	Complementación bimolecular fluorescente
bp	Par(es) de bases
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
cADN	Ácido desoxiribonucleico complementario
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CDS	Secuencia codificante
CIP	<i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i> /Fosfatasa alcalina de intestino de vaca
Cl <sup>-</sup>	Ión cloruro
cm	Centimetro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> cv Columbia silvestre
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
Cyt	Citosólico
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
dS	deciSiemens
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ER	Retículo endoplásmico
ET	Etileno
g	Gram
GBq	Gigabecquerelio
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> / Proteína verde fluorescente
GST	<i>Glutathione S-transferase</i> / Glutación S-transferasa
GTE	Glucosa-Tris-EDTA
GUS	Beta-glucuronidasa
h	Hora
H <sup>+</sup>	Hidrógeno o Protón



His	Histidina
Hyg	Higromicina
IC	Intracelular
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
JA	Ácido Jasmónico
K <sup>+</sup>	Catión potasio
Kan	Kanamicina
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KIRC	Inward-rectifier K <sup>+</sup> channel
KORC	Outward-rectifier K <sup>+</sup> channel
kV	Kilovoltios
L	Litro
LAK	Solución mineral <i>Long-Ashton</i> modificada
LB	Medio <i>Lysogeny Broth</i> para crecimiento de bacterias
m	Metro
mA	Milliamperio
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milimetro
mM	Milimolar
mRNA	ARN mensajero
MS	Medio Murashige - Skoog para el crecimiento de plantas
mV	Millivoltios
N	Normal
N	Nitrógeno
Na <sup>+</sup>	Catión sodio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Amonio
nm	Nanometro
nM	Nanomolar
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
O.D.	Densidad óptica
o/n	<i>Overnight</i>
O <sub>3</sub>	Ozono
P	Fosforo
PA	Ácido Fosfatídico
PAR	Radiación activa fotosintética

PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PLATE	Solución de transformación de levaduras (PEG/ <i>Lithium acetate</i> /Tris/EDTA)
PM	Membrana plasmática
PP <sub>i</sub>	Pirofosfato inorgánico
PSII	Fotosistema II
QC	Centro quiescente de la raíz
RBOH	<i>Respiratory burst oxidase homolog</i>
RH	Humedad relativa
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
s	Segundos
SA	Ácido salicílico
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis de poliacrilamida con SDS
SOB	<i>Super Optimal Broth</i> , medio de cultivo bacteriano
SOC	<i>Super Optimal Broth with catabolite repression</i> , medio de cultivo bacteriano
SOD	Superóxido dismutasa
TAE	Tris/Acetato de Sodio/EDTA
Taq	ADN polimerasa aislada de <i>Thermus aquaticus</i>
T-DNA	<i>Transfer-ADN</i> , ADN-Ti.
TE	Tris:EDTA
TEMED	Tetrametiletilendiamina
T <sub>m</sub>	Temperatura de melting
TM	Dominio transmembrana
U	Unidad Enzimática
U.V.	Ultravioleta
Ura	Uracilo
V	Voltios
v	Volumen
w	Peso
Y2H	Ensayo de doble híbrido de levadura
YEP	Medio <i>Yeast Extract Peptone</i> para el crecimiento de <i>Agrobacterium</i>
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i> / Proteína Amarilla Fluorescente
YNB	Medio <i>Yeast Nitrogen Base</i> para el crecimiento de levaduras
YPD	Medio <i>Yeast Peptone Dextrose</i> para el crecimiento de levaduras
μCi	Microcurio

μL	Microlitro
μM	Micromolar
μmol	Micromolar

## Código Aminoácidos

<b>A</b>	Ala	<b>alanina</b>
<b>R</b>	Arg	<b>arginina</b>
<b>N</b>	Asn	<b>asparagina</b>
<b>D</b>	Asp	<b>ácido aspártico</b>
<b>C</b>	Cys	<b>cisteína</b>
<b>Q</b>	Gln	<b>glutamina</b>
<b>E</b>	Glu	<b>ácido glutámico</b>
<b>G</b>	Gly	<b>glicina</b>
<b>H</b>	His	<b>histidina</b>
<b>I</b>	Ile	<b>isoleucina</b>
<b>L</b>	Leu	<b>leucina</b>
<b>K</b>	Lys	<b>lisina</b>
<b>M</b>	Met	<b>metionina</b>
<b>F</b>	Phe	<b>fenilalanina</b>
<b>P</b>	Pro	<b>prolina</b>
<b>S</b>	Ser	<b>serina</b>
<b>T</b>	Thr	<b>treonina</b>
<b>W</b>	Trp	<b>triptofano</b>
<b>Y</b>	Tyr	<b>tirosina</b>
<b>V</b>	Val	<b>valina</b>

	Apolares		Polares Básicos (+)		Polares Ácidos (-)		Polares Neutros
---	----------	---	---------------------	---	--------------------	---	-----------------

## Anexo 2. Primers

### GRIK1

clonación	pGEX4T1 5'	5'-TAGAATTCATGTTTTGTGATAGTTTTGCATTGCCC-3'
	p414GPD 5'	5'-AAGGATCCACCATGTTTTGTGATAGTTTTGCATTGTC-3'
	GRIK1 3'	5'-TACTCGAGTCAGCTATGGTTTTGATCTTCTTCT-3'
Mutagenesis	pGEX4T1 5'	5'-GTGGTGGCGACCATCCTCCAA-3'

	SOS2 S159A 3'	5'-GCAATGCAGCTAGCCCGAAATCCGAAACCTTCAG-3'
	SOS2 T168A 3'	5'-GTTCCACACGTGGCACGCAGAAGTTCTACTCCTTCC-3'
	SOS2 Y175A 3'	5'-TGGAGCTACAGCGTTTCGGAGTTCCACATGTGGTA-3'
	GRIK1 K137R 3'	5'-AAAAGCCCGGATAGCATAATGCTTGTCATCG-3'
	pGEX4T1 3'	5'-TGTGTCAGAGGTTTTACCGTC-3'
	SOS2 S159A 5'	5'-GGATTTCGGGCTAGCTGCATTGCCTCAGGAAGGAGT-3'
	SOS2 T168A 5'	5'-TCTGCGTGCCACGTGTGGAACCCGAACTATGTAGC-3'
	SOS2 Y175A 5'	5'-AACTCCGAACGCTGTAGCTCCAGAGGTACTTAGTG-3'
	GRIK1 K137R 5'	5'-TATGCTATCCGGGCTTTTACAAGTCACATT-3'
Identificación T-ADN	GRIK1-2 LP	5'-TGGAGTTTCGACATGTTGCGAT-3'
	GRIK1-2 RP	5'-TGGTGATCCAATTTCCAATGAGC-3'
	GRIK2-1 LP	5'-TTTTGGAGCATCCTAACATCG-3'
	GRIK1-1 RP	5'-TGAACCATTGGAGGCTAAAAGA-3'
Control Expresión	GRIK1 5'	5'-GGTCTCCTTTGCAAAGATCCA-3'
	GRIK1 3'	5'-AAGAATTCAAGAGTCTTCTCAATACATGACCG-3'
	GRIK2 5'	5'-GGTCTCCTTTGCAAAGATCCG-3'
	GRIK1 3'	5'-AAGAATTCATGACCCCAAGCGAGGTC-3'
	tubulin 5'	5'-TCGTGGATCACAGCAATACA-3'
	tubulin 3'	5'-CCTCCTGCACTTCCACTTCG-3'
BiFC	GRIK1 5'	5'-CCGCGTGGATCCATGTTTTGTGATAGTTTGG -3'
	GRIK1 3'	5'-CGGCGCCCGGGGCTATGGTTTTGATCTTC -3'

## MAPK

BiFC	mpk6 3'	5'-GCAGGATCCGCCTTGCTGATATTCTGGA-3'
	mpk6 5'	5'-CGTAGGCCTATGGACGGTGGTTCAGGTC-3'
	mpk3 5'	5'-CGTAGGCCTATGAACACCGGCGGTGGCC-3'
	mpk3 3'	5'-CGAGGATCCGCCACCGTATGTTGGATTG-3'
Mutagenesis versiones hiperact.	Y144C 3	5'-TTGATGGAGATCAGTGTCATTAACACACGCGAT-3'
	D218G E222A 3	5'-CATCTCGTGACAACATAAGCAGTCATGAATCCACT-3'
	MPK6 HA 5'	5'-CCGCGTGGATCCATGGACGGTGGTT-3'
	D218G E222A 5'	5'-AGTCACTTCTGAGAGTGGATTCATGACTGCTTATG-3'
	MPK6 HA 3'	5'-GGCGCCCGGGCTATTGCTGATATTC-3'
	Y144C 5'	5'-AACGCTTTCAACGATGTTTACATCGCGTGTGAGTTA-3'
pFL MPK6 MKK2	MPK6 5'	5'-GCGGCCGCATGGACGGTGGTTCAG-3'
	MPK6 3'	5'-AATCCAGAATATCAGCAATAGGCGGCCGC-3'
	MKK2 5'	5'-GAATTCATGAAGAAAGGTGGA-3'
	MKK2 3'	5'-GTTTGTTTTATATAAGAATTC-3'

pYPGE15	MPK6 5'	5'-AGATCTATGGACGGTGGTTCAGGTCA-3'
MPK6	MPK6 3'	5'-GGATCCCTATTGCTGATATTCTGGATTG-3'
genotipado mutantes	6-3 LP	5'-GCAGTTCGGCTATGAATTCTG-3'
	6-3 RP	5'-GTTGTCACGAGATGGTACCGT-3'
	6-2 LP	5'-GACATAAGCGATGAGCCAGAG-3'
	6-2 RP	5'-ATCTATGTTGGCGTTTGCAAC-3'

## GSO1

clonación	GSO1-5'	5'-GGATCGGATCCATGCAACCACTAGTTC-3'
	GSO1-3'	5'-CCTAGCCCGGTTACAGCTTCTTATAAC-3'
BiFC	GSO1 pYeBYC 5'	5'-GTTACTGCAGCAGCAAGTCAGAAG-3'
	GSO1 pYeBYC 3'	5'-CCGGCCCGGGCAGCTTCTTATAACC-3'

## Anexo 3. Plásmidos

### Vectores de Expresión

Vector	organismo	referencia
GST-MPK6 pGEX4-T2	Bacteria	este trabajo
GST-MPK4 pGEX4-T2	Bacteria	este trabajo
GST-MPK3 pGEX4-T2	Bacteria	este trabajo
GST-MPK6 pEG(kt)	Levadura	este trabajo
GST-MPK6-Y144C pGEX4-T2	Bacteria	este trabajo
GST-MPK6-D218G E222A pGEX4-T2	Bacteria	este trabajo
GST-SOS2-T168D-Δ308 pEG(kt)	Levadura	Quintero, 2010
GST-SOS2-T168D-Δ308 pGEX4-T2	Bacteria	Guo, 2002
GST-SOS1-GIV pGEX4-T2	Bacteria	este trabajo
GST-SOS1-GIV-DSPA pGEX4-T2	Bacteria	este trabajo
GST-SOS1-GIV-DAPS pGEX4-T2	Bacteria	este trabajo
GST-SOS1-GIV-DAPA pGEX4-T2	Bacteria	este trabajo
GST-SOS1-GIV-DDPS pGEX4-T2	Bacteria	este trabajo
GST-SOS1-GIV-DSPD pGEX4-T2	Bacteria	este trabajo
GST-SOS1-998 pEG(kt)	Levadura	Quintero, 2010
GST-SOS1-998-DSPA pEG(kt)	Levadura	Quintero, 2010
GST-SOS1-998-DAPS pEG(kt)	Levadura	Quintero, 2010
GST-SOS1-998-DAPA pEG(kt)	Levadura	Quintero, 2010

GST-SOS1-998-DDPS pEG(kt)	Levadura	Quintero, 2010
GST-SOS1-998-DSPD pEG(kt)	Levadura	Quintero, 2010
GRIK1 pGEX4-T1	Bacteria	este trabajo
GRIK2 pGEX4-T1	Bacteria	este trabajo
SOS2-K40N pGEX4-T1	Bacteria	este trabajo
SOS2-S159A pGEX4-T1	Bacteria	este trabajo
SOS2-T168A pGEX4-T1	Bacteria	este trabajo
SOS2-Y175A pGEX4-T1	Bacteria	este trabajo
GRIK1-K137R pGEX4-T1	Bacteria	este trabajo
SOS2-T168A-Δ308 pGEX4-T1	Bacteria	este trabajo
SOS1-CT148 pGEX4-T1	Bacteria	este trabajo
GSO1-DK pGEX4-T2	Bacteria	este trabajo
pGEX4-T1	Bacteria	GE Healthcare
pGEX4-T2	Bacteria	GE Healthcare
pEG(kt)	Levadura	Mitchell, 1993

Vector	organismo	referencia
SOS1 pYPGE15	Levadura (multicopia)/bacteria	Quintero, 2002
SOS1-DAPS pYPGE15	Levadura (multicopia)/bacteria	este trabajo (Irene Villalta)
SOS1-DSPA pYPGE15	Levadura (multicopia)/bacteria	este trabajo (Irene Villalta)
SOS1-DAPA pYPGE15	Levadura (multicopia)/bacteria	este trabajo (Irene Villalta)
SOS1-DDPS pYPGE15	Levadura (multicopia)/bacteria	este trabajo (Irene Villalta)
SOS1-DDPD pYPGE15	Levadura (multicopia)/bacteria	este trabajo (Irene Villalta)
MPK3 pYPGE15	Levadura (multicopia)/bacteria	este trabajo
MPK4 pYPGE15	Levadura (multicopia)/bacteria	este trabajo
MPK6 pYPGE15	Levadura (multicopia)/bacteria	este trabajo
MPK6-Y144C pYPGE15	Levadura (multicopia)/bacteria	este trabajo
SOS2-AAA p414GPD	Levadura (multicopia)/bacteria	este trabajo
SOS2 p414GPD	Levadura (multicopia)/bacteria	Guo, 2004
SOS2-AAA-Δ308 p414GPD	Levadura (multicopia)/bacteria	este trabajo
SOS2-T168D-Δ308 p414GPD	Levadura (multicopia)/bacteria	Guo, 2004
SOS1 pDR425GPD	Levadura (multicopia)/bacteria	Quintero, 2011
SOS1-DAPS pDR425 GPD	Levadura (multicopia)/bacteria	este trabajo (Imelda Mendoza)
SOS3 p425GPD	Levadura (multicopia)/bacteria	Quintero, 2002

SOS2 SOS3 pFLT	Levadura (multicopia)/bacteria	Quintero, 2011
MPK6 MKK2 pFLT/pAAR	Levadura (multicopia)/bacteria	este trabajo
HKT1 pDR195	Levadura (multicopia)/bacteria	
GRIK1 p425GPD	Levadura (multicopia)/bacteria	este trabajo
GSO1 p425GPD	Levadura (multicopia)/bacteria	este trabajo
pDR195	Levadura (multicopia)/bacteria	Rentsch, 1995
pYPGE15	Levadura (multicopia)/bacteria	Brunelli, 1993
p425GPD	Levadura (multicopia)/bacteria	Mumber, 1995
p414GPD	Levadura (multicopia)/bacteria	este trabajo
pFLT	Levadura (multicopia)/bacteria	Quintero, 2002

### Vectores binarios

Vector	organismo	referencia
MPK3 pSPYCE(M)	Planta/Bacteria	este trabajo
MPK6 pSPYCE(M)	Planta/Bacteria	este trabajo
GRIK1 pSPYNE173	Planta/Bacteria	este trabajo (F.Gómez)
SOS2 pSPYCE(M)	Planta/Bacteria	Barragán, 2012
SOS1 pSPYNE173	Planta/Bacteria	Núñez-Ramírez, 2011
GRIK1 pYEBYC	Levadura(multicopia)/bacteria	este trabajo
SOS2 pYEBYN	Levadura(multicopia)/bacteria	este trabajo
GSO1-DJK pYEBYCM	Levadura(multicopia)/bacteria	este trabajo
HKT1 pYEBYN	Levadura(multicopia)/bacteria	este trabajo
pSPYNE173	Planta/Bacteria	Waadt, 2008
pSPYCE(M)	Planta/Bacteria	Waadt, 2008
pYEBYCM	Levadura(multicopia)/bacteria	
pYEBYN	Levadura(multicopia)/bacteria	

Vector	organismo	referencia
SOS2 pCAMBIA1200	Planta/Bacteria	este trabajo (Fujii)
SOS2-S159A pCAMBIA1200	Planta/Bacteria	este trabajo (Fujii)

SOS2-T168A pCAMBIA1200	Planta/Bacteria	este trabajo (Fujii)
SOS2-Y175A pCAMBIA1200	Planta/Bacteria	este trabajo (Fujii)
pCAMBIA1200	Planta/Bacteria	





## Bibliografía

1. Daliakopoulos IN, et al. (2016) The threat of soil salinity: A European scale review. *Sci Total Environ* 573:727–739.
2. Rengasamy P (2006) World salinization with emphasis on Australia. *J Exp Bot* 57(5):1017–1023.
3. Brevik EC, et al. (2015) The interdisciplinary nature of Soil. *Soil* 1(1):117–129.
4. F.A.O. Aquastat, 2016. Available at: <http://www.fao.org/land-water/aquastat/en/>.
5. Geeson NA, Brandt CJ, Thornes JB eds. (2003) *Mediterranean Desertification: A Mosaic of Processes and Responses* (John Wiley & Sons).
6. Raats PAC (2015) Salinity management in the coastal region of the Netherlands: A historical perspective. *Agric Water Manag* 157:12–30.
7. van Weert F, van der Gun J, Reckman J (2009) Global Overview of Saline Groundwater Occurrence and Genesis. *Int Groundw Resour Assess Cent* (July):107.
8. Trnka M, et al. (2013) Consequences of climate change for the soil climate in Central Europe and the central plains of the United States. *Clim Change* 120(1–2):405–418.
9. Fan X, et al. (2012) Soil salinity development in the yellow river delta in relation to groundwater dynamics. *L Degrad Dev* 23(2):175–189.
10. Mateo-sagasta J (2010) Agriculture and water quality interactions: a global overview. *Fao* 8:25–34.
11. Beek C Van, Tóth G (2010) *RISK ASSESSMENT METHODOLOGIES of Soil Threats in Europe - Status and options for harmonization* - doi:10.2788/47096.
12. Eckelmann W, et al. (2006) Common Criteria for Risk Area Identification according to Soil Threats. *Eur SOIL Bur Res Rep NO 20*:108.
13. Moreira Barradas J, Abdelfattah A, Matula S, Dolezal F (2014) Effect of Fertigation on Soil Salinization and Aggregate Stability. *J Irrig Drain Eng* 141(4):5014010.
14. Moral R, et al. (2008) Salinity, organic content, micronutrients and heavy metals in pig slurries from South-eastern Spain. *Waste Manag* 28(2):367–371.
15. Lefebvre O, Moletta R (2006) Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: A literature review. *Water Res* 40(20):3671–3682.
16. Van-camp L, et al. (2004) REPORTS OF THE TECHNICAL WORKING GROUPS VOLUME - III.
17. Sparks D (2014) *Environmental Soil Chemistry* (Academic Press).
18. Sterling SM, Ducharne A, Polcher J (2012) The impact of global land-cover change on the terrestrial water cycle. *Nat Clim Chang* 3(4):385–390.
19. Vautard R, et al. (2014) The European climate under a 2° C global warming. *Environ Res Lett*. doi:10.1088/1748-9326/9/3/034006.

20. Hinkel J, et al. (2014) Coastal flood damage and adaptation costs under 21st century sea-level rise. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(9):3292–3297.
21. Taylor RG (2013) Ground water and climate change. 3(April). doi:10.1038/NCLIMATE1744.
22. Chen Z, Grasby SE, Osadetz KG (2004) Relation between climate variability and groundwater levels in the upper carbonate aquifer , southern Manitoba , Canada. 290:43–62.
23. Technical I, Vi P *Climate change and water*.
24. FAO FAO Crops Tolerance Data. Available at: <http://www.fao.org/docrep/005/y4263e/y4263e0e.htm/>.
25. Tester M, Davenport R (2003) Na<sup>+</sup> Tolerance and Na<sup>+</sup> Transport in Higher Plants. *Ann Bot* 91(5):503–527.
26. Hasegawa PM, Bressan RA (2000) Plant Cellular and Molecular Responses to High Salinity.
27. Koyama ML, Levesley a, Koebner RM, Flowers TJ, Yeo a R (2001) Quantitative trait loci for component physiological traits determining salt tolerance in rice. *Plant Physiol* 125(1):406–22.
28. Borsani O, Valpuesta V, Botella MA (2003) Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology approach. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 73(2):101–115.
29. Flowers TJ (2004) Improving crop salt tolerance. *J Exp Bot* 55(396):307–319.
30. Bressan RA, et al. (1990) Reduced cell expansion and changes in cell walls of plants cells adapted to NaCl. *Environmental Injury to Plants* (Katterman F. Academic Press), pp 131–171.
31. Binzel ML, Hasegawa PM, Handa AK, Bressan RA (1985) Adaptation of tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol* 79:118–125.
32. Flowers TJ, Hajibagheri M, Clipson N (1986) Halophytes. *Q Rev Biol* 61(3):3–47.
33. Zhu JK (2001) Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci* 6(2):66–71.
34. Munns R, Termaat A (1986) Whole-plant responses to salinity. *Aust J Plant Physiol* 13(1977):143–160.
35. Zhu JK (2002) SALT AND DROUGHT STRESS SIGNAL TRANSDUCTION IN PLANTS. *Annu Rev Plant Biol* 53:247–273.
36. Iyengar E, Reddy M (1996) Photosynthesis in highly salt-tolerance plants. *Handbook of Photosynthesis*, ed Pessaraki M (Marcel Dekker), pp 2693–2699.
37. Khan M, Weber D eds. (2008) *Ecophysiology of Hight Salinity Tolerant Plants* (Springer Science).
38. Niu X, Bressan R a., Hasegawa PM, Pardo JM (1995) Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments. *Plant Physiol* 109:735–742.

39. Parida AK, Das AB (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicol Environ Saf* 60(3):324–349.
40. Serrano R, et al. (1999) A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *J Exp Bot* 50:1023–1050.
41. Saha P, Chatterjee P, Biswas A (2010) NaCl pretreatment alleviates salt stress by enhancement of antioxidant defense system and osmolyte accumulation in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek. *Indian J Exp Biol* 48(6):593–600.
42. Allakhverdiev SI, Sakamoto a, Nishiyama Y, Inaba M, Murata N (2000) Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plant Physiol* 123(3):1047–1056.
43. Stepien P, Klobus G (2005) Antioxidant defense in the leaves of C3 and C4 plants under salinity stress. *Physiol Plant* 125(1):31–40.
44. Gomes-Filho E, et al. (2008) Cowpea ribonuclease: Properties and effect of NaCl-salinity on its activation during seed germination and seedling establishment. *Plant Cell Rep* 27(1):147–157.
45. Dantas B, Ribeiro L, Aragao C (2007) Germination, Initial Growth and Cotyledon Protein Content of Bean Cultivars Under Salinity Stress. *Rev Bras Sementes* 29(2):106–110.
46. Hasanuzzaman M, Kamrun N, Fujita M (2013) Plant Response to Salt Stress and Role of Exogenous Protectants to Mitigate Salt-Induced Damages. *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*, ed Ahmad P (Springer Science), pp 25–87.
47. Greenway H, Munns R (1980) Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annu Rev Plant Physiol* 31:149–190.
48. Cheeseman JM (1988) Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiol* 87(3):547–50.
49. Apel K, Hirt H (2004) REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55(1):373–399.
50. Ahmad P, Jaleel C a., Sharma S (2010) Antioxidant defense system, lipid peroxidation, proline-metabolizing enzymes, and biochemical activities in two *Morus alba* genotypes subjected to NaCl stress. *Russ J Plant Physiol* 57(4):509–517.
51. Ahmad P, Jaleel CA, Salem M a, Nabi G, Sharma S (2010) Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit Rev Biotechnol* 30(3):161–175.
52. Zhu J-K (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr Opin Plant Biol* 6(5):441–445.
53. Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ* 25(2):239–250.
54. Berthomieu P, et al. (2003) Functional analysis of AtHKT1 in *Arabidopsis* shows that Na<sup>+</sup> recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J* 22(9):2004–2014.
55. Davenport RJ, et al. (2007) The Na<sup>+</sup> transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na<sup>+</sup> from the xylem in *Arabidopsis*. *Plant, Cell Environ* 30(4):497–507.

56. Sunarpi, et al. (2005) Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na<sup>+</sup> unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant J* 44(6):928–938.
57. Mäser P, et al. (2002) Altered shoot/root Na<sup>+</sup> distribution and bifurcating salt sensitivity in Arabidopsis by genetic disruption of the Na<sup>+</sup> transporter AtHKT1. *FEBS Lett* 531:157–161.
58. A. R. Yeo, M. E. Yeo TJF (1987) The Contribution of an Apoplastic Pathway to Sodium Uptake by Rice Roots in Saline Conditions. *J Exp Bot* 38(7):1141–1153.
59. Demidchik V, Maathuis FJM (2007) Physiological roles of nonselective cation channels in plants: From salt stress to signalling and development. *New Phytol* 175(3):387–404.
60. Schachtman DP, Kumar R, Schroeder JI, Marsh EL (1997) Molecular and functional characterization of a novel low-affinity cation transporter (LCT1) in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20):11079–84.
61. Maathuis FJM, Amtmann A (1999) K<sup>+</sup> Nutrition and Na<sup>+</sup> Toxicity : The Basis of Cellular K<sup>+</sup> / Na<sup>+</sup> Ratios. *Ann Bot* 84(2):123–133.
62. Blumwald E, Aharon GS, Apse MP (2000) Sodium transport in plant cells. *Biochim Biophys Acta* 1465:140–151.
63. Rodriguez-Navarro A, Rubio F (2006) High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *J Exp Bot* 57(5):1149–1160.
64. Qi Z, Spalding EP (2004) Protection of Plasma Membrane K<sup>+</sup> Transport by the Salt Overly Sensitive1 Na<sup>+</sup> -H<sup>+</sup> Antiporter during Salinity Stress 1. *Plant Physiol* 136(September):2548–2555.
65. Shi H, Quintero FJ, Pardo JM, Zhu JK (2002) The putative plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter SOS1 controls long-distance Na<sup>+</sup> transport in plants. *Plant Cell* 14(2):465–477.
66. Pardo JM (2010) Biotechnology of water and salinity stress tolerance. *Curr Opin Biotechnol* 21(2):185–96.
67. Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu JK (2000) The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12):6896–901.
68. Qiu Q-S, Guo Y, Dietrich M a, Schumaker KS, Zhu J-K (2002) Regulation of SOS1, a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in Arabidopsis thaliana, by SOS2 and SOS3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(12):8436–41.
69. Flowers TJ, Colmer TD (2008) Salinity tolerance in halophytes. *New Phytol* 179(4):945–963.
70. Shabala S, Mackay A (2011) *Ion Transport in Halophytes* doi:10.1016/B978-0-12-387692-8.00005-9.
71. Shabala S (2013) Learning from halophytes: Physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. *Ann Bot* 112(7):1209–1221.
72. Bonales-Alatorre E, Shabala S, Chen Z-H, Pottosin I (2013) Reduced Tonoplast Fast-Activating and Slow-Activating Channel Activity Is Essential for Conferring Salinity Tolerance in a Facultative Halophyte, Quinoa. *Plant Physiol* 162(2):940–952.

73. Saqib M, Zörb C, Rengel Z, Schubert S (2005) The expression of the endogenous vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in roots and shoots correlates positively with the salt resistance of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci* 169(5):959–965.
74. Davenport RJ, Reid RJ, Smith F a. (1997) Sodium-calcium interactions in two wheat species differing in salinity tolerance. *Physiol Plant* 99(2):323–327.
75. Munns R, James RA, Läuchli A (2006) Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J Exp Bot* 57(5):1025–1043.
76. Apse MP, Aharon GS, Snedden W a, Blumwald E (1999) Salt Tolerance Conferred by Overexpression of a Vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiport in Arabidopsis. *Science* 285(5431):1256–1258.
77. Zhang HX, Blumwald E (2001) Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat Biotechnol* 19(8):765–8.
78. Apse MP, Sottosanto JB, Blumwald E (2003) Vacuolar cation/H<sup>+</sup> exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of AtNHX1, the Arabidopsis vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Plant J* 36(2):229–239.
79. Leidi EO, et al. (2010) The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *Plant J* 61(3):495–506.
80. Zhao J, et al. (2009) Functional studies of split Arabidopsis Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. *J Biol Chem* 284(49):34075–34083.
81. Chanroj S, et al. (2012) Conserved and Diversified Gene Families of Monovalent Cation/H<sup>+</sup> Antiporters from Algae to Flowering Plants. *Front Plant Sci* 3(February):1–18.
82. Hedrich R, Marten I (2011) TPC1 - SV channels gain shape. *Mol Plant* 4(3):428–441.
83. Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217(4566):1214–1222.
84. Delauney A, Verma D (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J* 4:215–223.
85. McCue KF, Hanson AD (1990) Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends Biotechnol* 8(C):358–362.
86. Chen THH, Murata N (2002) Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr Opin Plant Biol* 5(3):250–257.
87. Dat J, et al. (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* 57(5):779–795.
88. Hammond-Kosack KE, Jones JD (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8(10):1773–1791.
89. Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141(2):391–396.
90. Asada K, Takahashi M (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. *Photoinhibition*, eds Kyle D, Osborne C, Arntzen C (Elsevier), pp 227–

91. Roxas VP, Smith Jr. RK, Allen ER, Allen RD (1997) Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nat Biotechnol* 15(10):988–991.
92. Tanaka Y, et al. (1999) Salt tolerance of transgenic rice overexpressing yeast mitochondrial Mn-SOD in chloroplasts. *Plant Sci* 148(2):131–138.
93. Conklin PL, Williams EH, Last RL (1996) Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient Arabidopsis mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18):9970–4.
94. Mittler R (2016) ROS Are Good. *Trends Plant Sci* 22(1):11–19.
95. Zhu J (2016) Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell* 167(2):313–324.
96. Bush D (1995) Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu Rev Plant Biol*:95–122.
97. Sanders D, Brownlee C, Harper J (1999) Communicating with calcium. *Plant Cell* 11(4):691–706.
98. Knight H (2000) Calcium signaling during abiotic stress in plants. *Int Rev Cytol* 195:269–324.
99. McAinsh MR, Hetherington AM (1998) Encoding specificity in Ca<sup>2+</sup> signalling systems. *Trends Plant Sci* 3(1):32–36.
100. Kudla J, Batistic O, Hashimoto K (2010) Calcium Signals: The Lead Currency of Plant Information Processing. *Plant Cell* 22(3):541–563.
101. Yuan F, et al. (2014) OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca<sup>2+</sup> increases vital for osmosensing in Arabidopsis. *Nature* 514(7522):367–71.
102. Hamilton ES, et al. (2015) Mechanosensitive channel MSL8 regulates osmotic forces during pollen hydration and germination. *Science* (80- ) 350(September):438–41.
103. Swarbreck SM, Colaco R, Davies JM (2013) Plant calcium-permeable channels. *Plant Physiol* 163(2):514–522.
104. Chen X, Chang M, Wang B, Wu B (1997) Cloning of a Ca<sup>2+</sup>-ATPase gene and the role of cytosolic Ca<sup>2+</sup> in the gibberellin-dependent signaling pathway in aleurone cells. *Plant J* 11(3):363–71.
105. Harper JF, et al. (1998) A novel calmodulin-regulated Ca<sup>2+</sup>-ATPase (ACA2) from Arabidopsis with an N-terminal autoinhibitory domain. *J Biol Chem* 273(2):1099–1106.
106. Shigaki T, Hirschi KD (2006) Diverse functions and molecular properties emerging for CAX cation/H<sup>+</sup> exchangers in plants. *Plant Biol* 8(4):419–429.
107. Pottosin I, Wherrett T, Shabala S (2009) SV channels dominate the vacuolar Ca<sup>2+</sup> release during intracellular signaling. *FEBS Lett* 583(5):921–926.
108. Ranf S, et al. (2008) Loss of the vacuolar cation channel, AtTPC1, does not impair Ca<sup>2+</sup> signals induced by abiotic and biotic stresses. *Plant J* 53(2):287–299.

109. Drerup M, Schlücking K, Hashimoto K, Manishankar P (2013) The Calcineurin B-Like Calcium Sensors CBL1 and CBL9 Together with Their Interacting Protein Kinase CIPK26 Regulate the Arabidopsis NADPH Oxidase RBOHF. *6*(2):559–569.
110. Harper JF, Breton G, Harmon A (2004) DECODING Ca<sup>2+</sup> SIGNALS THROUGH PLANT PROTEIN KINASES. *Annu Rev Plant Biol* 55:263–88.
111. Liu J, Zhu JK (1998) A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science* (80- ) 280(5371):1943–1945.
112. Mao J, et al. (2016) Mechanisms and physiological roles of the CBL-CIPK networking system in Arabidopsis thaliana. *Genes (Basel)* 7(9):1–15.
113. Marino D, Dunand C, Puppo A, Pauly N (2012) A burst of plant NADPH oxidases. *Trends Plant Sci* 17(1):9–15.
114. Xie YJ, et al. (2011) Evidence of Arabidopsis salt acclimation induced by up-regulation of HY1 and the regulatory role of RbohD-derived reactive oxygen species synthesis. *Plant J* 66(2):280–292.
115. Ma L, et al. (2012) NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF function in ROS-dependent regulation of Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> homeostasis in Arabidopsis under salt stress. *Access* 63(1):305–317.
116. Chung J, Zhu J, Bressan RA, Hasegawa PM, Shi H (2011) Reactive oxygen species mediate Na<sup>+</sup>-induced SOS1 mRNA stability in Arabidopsis. *53*(3):554–565.
117. Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell Environ* 33(4):453–467.
118. Shabala S, Wu H, Bose J (2015) Salt stress sensing and early signalling events in plant roots: Current knowledge and hypothesis. *Plant Sci* 241:109–119.
119. Hou Q, Ufer G, Bartels D (2016) Lipid signalling in plant responses to abiotic stress. *Plant, Cell Environ* 39(5):1029–1048.
120. Testerink C, Munnik T (2005) Phosphatidic acid: A multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends Plant Sci* 10(8):368–375.
121. Wang X (2004) Lipid signaling. *Curr Opin Plant Biol* 7(3):329–336.
122. De Jong CF, et al. (2004) Phosphatidic acid accumulation is an early response in the Cf-4/Avr4 interaction. *Plant J* 39(1):1–12.
123. Arisz SA, Testerink C, Munnik T (2009) Plant PA signaling via diacylglycerol kinase. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1791(9):869–875.
124. Andersson MX, Kourtchenko O, Dangl JL, Mackey D, Ellerström M (2006) Phospholipase-dependent signalling during the AvrRpm1- and AvrRpt2-induced disease resistance responses in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 47(6):947–959.
125. Bargmann BOR, et al. (2009) Multiple PLDs required for high salinity and water deficit tolerance in plants. *Plant Cell Physiol* 50(1):78–89.
126. Zhang W, Qin C, Zhao J, Wang X (2004) Phospholipase D alpha 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proc Natl*



*Acad Sci U S A* 101(25):9508–9513.

127. Distéfano AM, Scuffi D, García-Mata C, Lamattina L, Laxalt AM (2012) Phospholipase D?? is involved in nitric oxide-induced stomatal closure. *Planta* 236(6):1899–1907.
128. Guo L, Wang X (2012) Crosstalk between Phospholipase D and Sphingosine Kinase in Plant Stress Signaling. *Front Plant Sci* 3(March):51.
129. Zhang Y, et al. (2009) Phospholipase dalpha1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in Arabidopsis. *Plant Cell* 21(8):2357–77.
130. Koag M-C, Fenton RD, Wilkens S, Close TJ (2003) The binding of maize DHN1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity. *Plant Physiol* 131(1):309–16.
131. Julkowska MM, Testerink C (2015) Tuning plant signaling and growth to survive salt. *Trends Plant Sci* 20(9):586–594.
132. Kim SC, Guo L, Wang X (2013) Phosphatidic acid binds to cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and promotes its cleavage in Arabidopsis. *J Biol Chem* 288(17):11834–11844.
133. McLoughlin F, Testerink C (2013) Phosphatidic acid , a versatile water-stress signal in roots. 4(December):1–8.
134. Monreal JA, McLoughlin F, Echevarría C, García-Mauriño S, Testerink C (2010) Phosphoenolpyruvate carboxylase from C4 leaves is selectively targeted for inhibition by anionic phospholipids. *Plant Physiol* 152(2):634–638.
135. Guo L, et al. (2012) Cytosolic Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenases Interact with Phospholipase D to Transduce Hydrogen Peroxide Signals in the Arabidopsis Response to Stress. *Plant Cell* 24(5):2200–2212.
136. McLoughlin F, et al. (2012) The Snf1-related protein kinases SnRK2.4 and SnRK2.10 are involved in maintenance of root system architecture during salt stress. *Plant J* 72(3):436–449.
137. Testerink C, et al. (2004) Isolation and identification of phosphatidic acid targets from plants. *Plant J* 39(4):527–536.
138. Loughlin FMC, et al. (2013) Identification of novel candidate phosphatidic acid-binding proteins involved in the salt-stress response of Arabidopsis thaliana roots. 581:573–581.
139. Lee S, Park J, Lee Y (2003) Phosphatidic acid induces actin polymerization by activating protein kinases in soybean cells. *Mol Cells* 15(3):313–319.
140. Zhang Q, et al. (2012) Phosphatidic acid regulates microtubule organization by interacting with MAP65-1 in response to salt stress in Arabidopsis. *Plant Cell* 24(11):4555–4576.
141. Yu L, et al. (2010) Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in Arabidopsis thaliana. *New Phytol*:762–773.
142. Colcombet J, Hirt H (2008) Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem J* 413(2):217–226.

143. Ichimaru K, MAPK. G (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants : a new nomenclature. *Trends Plant Sci* 7(7):301–308.
144. Champion A, Picaud A, Henry Y (2004) Reassessing the MAP3K and MAP4K relationships. *Trends Plant Sci* 9(3):123–129.
145. Cristina M, Rodriguez S, Petersen M, Mundy J Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plants. *Annu Rev Plant Biol*:621–652.
146. Qiu J-L, et al. (2008) Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1. *Plant Physiol* 148(1):212–22.
147. Asai T, et al. (2002) MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* 415(6875):977–83.
148. Lampard GR, Wengier DL, Bergmann DC (2014) Manipulation of mitogen-activated protein kinase kinase signaling in the Arabidopsis stomatal lineage reveals motifs that contribute to protein localization and signaling specificity. *Plant Cell* 26(8):3358–71.
149. Suarez-Rodriguez MC, et al. (2007) MEKK1 Is Required for flg22-Induced MPK4 Activation in Arabidopsis Plants. *Plant Physiol* 143(2):661–669.
150. Brill JA, Elion EA, Fink GR (1994) A role for autophosphorylation revealed by activated alleles of FUS3, the yeast MAP kinase homolog. *Mol Biol Cell* 5(3):297–312.
151. Brunner D, et al. (1994) A gain-of-function mutation in Drosophila MAP kinase activates multiple receptor tyrosine kinase signaling pathways. *Cell* 76(5):875–888.
152. Yaakov G, Bell M, Hohmann S, Engelberg D (2003) Combination of two activating mutations in one HOG1 gene forms hyperactive enzymes that induce growth arrest. *Mol Cell Biol* 23(14):4826–4840.
153. Berriri S, et al. (2012) Constitutively Active Mitogen-Activated Protein Kinase Versions Reveal Functions of Arabidopsis MPK4 in Pathogen Defense Signaling. *Plant Cell* 24(October):1–14.
154. Tanoue T, Adachi M, Moriguchi T, Nishida E (2000) A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol* 2(2):110–116.
155. Chinchilla D, et al. (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448(7152):497–500.
156. Gómez-Gómez L, Boller T (2000) FLS2: An LRR Receptor-like Kinase Involved in the Perception of the Bacterial Elicitor Flagellin in Arabidopsis. *Mol Cell* 5(6):1003–1011.
157. Nuhse TS, Bottrill AR, Jones AME, Peck SC (2007) Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses. *Plant J* 51(5):931–940.
158. Zipfel C, et al. (2004) Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature* 428(6984):764–767.
159. Ichimura K, Casais C, Peck SC, Shinozaki K, Shirasu K (2006) MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in Arabidopsis. *J Biol Chem* 281(48):36969–36976.

160. Schweighofer A, et al. (2007) The PP2C-Type Phosphatase AP2C1, Which Negatively Regulates MPK4 and MPK6, Modulates Innate Immunity, Jasmonic Acid, and Ethylene Levels in Arabidopsis. *Plant Cell Online* 19(7):2213–2224.
161. Ren D, Yang H, Zhang S (2002) Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in Arabidopsis. *J Biol Chem* 277(1):559–565.
162. Dóczy R, et al. (2007) The Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase MKK3 is upstream of group C mitogen-activated protein kinases and participates in pathogen signaling. *Plant Cell* 19(10):3266–3279.
163. Moon H, et al. (2003) NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(1):358–363.
164. Rentel MC, et al. (2004) OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in Arabidopsis. *Nature* 427(6977):858–861.
165. Ortiz-Masia D, Perez-Amador MA, Carbonell J, Marcote MJ (2007) Diverse stress signals activate the C1 subgroup MAP kinases of Arabidopsis. *FEBS Lett* 581(9):1834–1840.
166. Jin SL, Ellis BE (2007) Arabidopsis MAPK phosphatase 2 (MKP2) positively regulates oxidative stress tolerance and inactivates the MPK3 and MPK6 MAPKs. *J Biol Chem* 282(34):25020–25029.
167. Vilela B, Lumberras V (2010) Regulation of MAPK signaling and cell death by MAPK phosphatase MKP2. (november):1497–1500.
168. Kroj T, et al. (2003) Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley. *J Biol Chem* 278(4):2256–2264.
169. Ligterink W, Kroj T, Nieden U, Hirt H (1997) Receptor-Mediated Activation of a MAP Kinase in Pathogen Defense of Plants Receptor-Mediated Activation of a MAP Kinase in Pathogen Defense of Plants. *Science* (80- ) 2054(1997). doi:10.1126/science.276.5321.2054.
170. Smékalová V, Doskočilová A, Komis G, Šamaj J (2014) Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnol Adv* 32(1):2–11.
171. Xing Y, Jia W, Zhang J (2007) AtMEK1 mediates stress-induced gene expression of CAT1 catalase by triggering H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in Arabidopsis. *J Exp Bot* 58(11):2969–2981.
172. Burnett EC, Desikan R, Moser RC, Neill SJ (2000) ABA activation of an MBP kinase in *Pisum sativum* epidermal peels correlates with stomatal responses to ABA. *J Exp Bot* 51(343):197–205.
173. Gudesblat GE, Iusem ND, Morris PC (2007) Guard cell-specific inhibition of Arabidopsis MPK3 expression causes abnormal stomatal responses to abscisic acid and hydrogen peroxide. *New Phytol* 173(4):713–721.
174. Zhao Z, Zhang W, Stanley B a, Assmann SM (2008) Functional proteomics of Arabidopsis thaliana guard cells uncovers new stomatal signaling pathways. *Plant Cell* 20(12):3210–3226.

175. Li K, et al. (2016) AIK1, A mitogen-activated protein Kinase, Modulates Absciscic Acid Responses through the MKK5-MPK6 kinase Cascade. *Plant Physiol* 173(February):pp.01386.2016.
176. Yoo S-D, Cho Y-H, Tena G, Xiong Y, Sheen J (2008) Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C2H4 signalling. *Nature* 451(7180):789–95.
177. Yoo S, Sheen J (2008) MAPK signaling in plant hormone ethylene signal transduction. *Science (80- )* 3(October):848–849.
178. Teige M, et al. (2004) The MKK2 Pathway Mediates Cold and Salt Stress Signaling in Arabidopsis. *Stress Int J Biol Stress* 15:141–152.
179. Ichimura K, Mizoguchi T, Yoshida R, Yuasa T, Shinozaki K (2000) Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP. *Science (80- )* 24:655–665.
180. Ning J, Li X, Hicks LM, Xiong L (2010) A Raf-like MAPKKK gene DSM1 mediates drought resistance through reactive oxygen species scavenging in rice. *Plant Physiol* 152(2):876–890.
181. Kim JKDWS (2012) Arabidopsis MKKK20 is involved in osmotic stress response via regulation of MPK6 activity. *J Plant Biol*:217–224.
182. Su SH, Suarez-Rodriguez MC, Krysan P (2007) Genetic interaction and phenotypic analysis of the Arabidopsis MAP kinase pathway mutations mekk1 and mpk4 suggests signaling pathway complexity. *FEBS Lett* 581(17):3171–3177.
183. Zhou C, Cai Z, Guo Y, Gan S (2009) An arabidopsis mitogen-activated protein kinase cascade, MKK9-MPK6, plays a role in leaf senescence. *Plant Physiol* 150(1):167–177.
184. Liu XM, et al. (2013) Phosphorylation of the zinc finger transcriptional regulator ZAT6 by MPK6 regulates Arabidopsis seed germination under salt and osmotic stress. *Biochem Biophys Res Commun* 430(3):1054–1059.
185. Arabidopsis eFP Browser Available at: <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>.
186. NCBI Align Sequences Protein BLAST. Available at: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&BLAST\\_SPEC=blast2seq&LINK\\_LOC=blasttab](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=blasttab).
187. Feilner T (2005) High Throughput Identification of Potential Arabidopsis Mitogen-activated Protein Kinases Substrates. *Mol Cell Proteomics* 4(10):1558–1568.
188. Baena-González E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* 448(7156):938–42.
189. Hrabak EM, et al. (2003) The Arabidopsis CDPK-SnRK Superfamily of Protein Kinases. *Plant Physiol* 132(2):666–680.
190. Umezawa T, et al. (2010) Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: Sensing, signaling and transport. *Plant Cell Physiol* 51(11):1821–1839.
191. Luan S (2009) The CBL-CIPK network in plant calcium signaling. *Trends Plant Sci* 14(1):37–42.
192. Halford NG, Hey SJ (2009) Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate

- network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochem J* 419:247–259.
193. Chaves-Sanjuan A, et al. (2014) Structural basis of the regulatory mechanism of the plant CIPK family of protein kinases controlling ion homeostasis and abiotic stress. *Proc Natl Acad Sci* 111(42):E4532–4541.
  194. Crozet P, et al. (2014) Mechanisms of regulation of SNF1/AMPK/SnRK1 protein kinases. *Front Plant Sci* 5(May):1–17.
  195. Scott JW, et al. (2004) CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest* 113(2):274–284.
  196. Emanuelle S, et al. (2015) SnRK1 from *Arabidopsis thaliana* is an atypical AMPK. 183–192.
  197. Boudsocq M, Barbier-Brygoo H, Laurière C (2004) Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 279(40):41758–41766.
  198. Boudsocq M (2005) Osmotic Signaling in Plants. Multiple Pathways Mediated by Emerging Kinase Families. *Plant Physiol* 138(3):1185–1194.
  199. Hardie DG (1999) Plant protein serine threonine kinases: classification and functions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:97–131.
  200. Mikołajczyk M, Awotunde OS, Muszyńska G, Klessig DF, Dobrowolska G (2000) Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *Plant Cell* 12(1):165–78.
  201. Yoshida R, et al. (2006) The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 281(8):5310–5318.
  202. Bucholc M, et al. (2011) SNF1-related protein kinases 2 are negatively regulated by a plant-specific calcium sensor. *J Biol Chem* 286(5):3429–3441.
  203. Lamotte O, et al. (2014) Protein S-nitrosylation: specificity and identification strategies in plants. *Front Chem* 2(January):114.
  204. Julkowska MM, et al. (2014) Identification and functional characterization of the *Arabidopsis* Snf1-related protein kinase SnRK2.4 phosphatidic acid-binding domain. *Plant Cell Environ* 38(3):614–624.
  205. Geiger D, et al. (2011) Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. *Sci Signal* 4(173):ra32.
  206. Maierhofer T, et al. (2014) Site- and kinase-specific phosphorylation-mediated activation of SLAC1, a guard cell anion channel stimulated by abscisic acid. *Sci Signal* 7(342):ra86.
  207. Sato A, et al. (2009) Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. *Biochem J* 424(3):439–448.
  208. Xue S, et al. (2011) Central functions of bicarbonate in S-type anion channel activation and OST1 protein kinase in CO<sub>2</sub> signal transduction in guard cell. *EMBO J* 30(8):1645–

1658.

209. Vahisalu T, et al. (2010) Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1. *Plant J* 62(3):442–453.
210. Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY (2006) Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. *Cell* 126(5):969–980.
211. Yoshida R (2002) ABA-Activated SnRK2 Protein Kinase is Required for Dehydration Stress Signaling in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 43(12):1473–1483.
212. Yoshida T, et al. (2015) Four Arabidopsis AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. *Plant, Cell Environ* 38(1):35–49.
213. Kulik A, Wawer I, Krzywińska E, Bucholc M, Dobrowolska G (2011) SnRK2 Protein Kinases—Key Regulators of Plant Response to Abiotic Stresses. *Omi A J Integr Biol* 15(12):859–872.
214. Shin R, Alvarez S, Burch AY, Jez JM, Schachtman DP (2007) Phosphoproteomic identification of targets of the Arabidopsis sucrose nonfermenting-like kinase SnRK2.8 reveals a connection to metabolic processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(15):6460–5.
215. Fujii H, Verslues PE, Zhu J-K (2011) Arabidopsis decuple mutant reveals the importance of SnRK2 kinases in osmotic stress responses in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:1717–1722.
216. Guo Y, Halfter U, Ishitani M, Zhu JK (2001) Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell* 13(June):1383–1400.
217. Du W, et al. (2011) Phosphorylation of SOS3-like calcium-binding proteins by their interacting SOS2-like protein kinases is a common regulatory mechanism in Arabidopsis. *Plant Physiol* 156(4):2235–2243.
218. Sánchez-Barrena MJ, Martínez-Ripoll M, Albert A (2013) Structural biology of a major signaling network that regulates plant abiotic stress: The CBL-CIPK mediated pathway. *Int J Mol Sci* 14(3):5734–5749.
219. Sánchez-Barrena MJ, Moreno-Pérez S, Angulo I, Martínez-Ripoll M, Albert A (2007) The complex between SOS3 and SOS2 regulatory domain from Arabidopsis thaliana: Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 63(7):568–570.
220. Quintero FJ, et al. (2011) Activation of the plasma membrane Na/H antiporter Salt-Overly-Sensitive 1 (SOS1) by phosphorylation of an auto-inhibitory C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(6):2611–6.
221. Xu J, et al. (2006) A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K<sup>+</sup> transporter AKT1 in Arabidopsis. *Cell* 125(7):1347–60.
222. Ragel P, et al. (2015) CIPK23 regulates HAK5-mediated high-affinity K<sup>+</sup> uptake in Arabidopsis roots. *Plant Physiol* 169(December):pp.01401.2015.

223. Ho CH, Lin SH, Hu HC, Tsay YF (2009) CHL1 Functions as a Nitrate Sensor in Plants. *Cell* 138(6):1184–1194.
224. Straub T, Ludewig U, Neuhaeuser B (2017) The Kinase CIPK23 Inhibits Ammonium Transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* (3):tpc.00806.2016.
225. L  ran S, et al. (2013) *Arabidopsis* NRT1.1 is a bidirectional transporter involved in root-to-shoot Nitrate translocation. *Mol Plant* 6(6):1984–1987.
226. Fuglsang AT, et al. (2007) *Arabidopsis* Protein Kinase PKS5 Inhibits the Plasma Membrane H<sup>+</sup> -ATPase by Preventing Interaction with 14-3-3 Protein. *Society* 19(May):1617–1634.
227. de la Torre F, et al. (2013) The Tomato Calcium Sensor Cbl10 and Its Interacting Protein Kinase CIPK6 Define a Signaling Pathway in Plant Immunity. *Plant Cell* 25(7):2748–2764.
228. Hanks SK, Hunter T (1995) The eukaryotic protein kinase superfamily : kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 9(8):576–596.
229. Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR (2010) *Abscisic acid: emergence of a core signaling network* doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112122.
230. Shen W, Reyes MI, Hanley-Bowdoin L (2009) *Arabidopsis* protein kinases GRIK1 and GRIK2 specifically activate SnRK1 by phosphorylating its activation loop. *Plant Physiol* 150(2):996–1005.
231. Guo Y (2004) Transgenic Evaluation of Activated Mutant Alleles of SOS2 Reveals a Critical Requirement for Its Kinase Activity and C-Terminal Regulatory Domain for Salt Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Online* 16(2):435–449.
232. Nolen B, Taylor S, Ghosh G (2004) Regulation of protein kinases: Controlling activity through activation segment conformation. *Mol Cell* 15(5):661–675.
233. Chen L, et al. (2009) Structural insight into the autoinhibition mechanism of AMP-activated protein kinase. *Nature* 459(7250):1146–1149.
234. Taylor SSS, Kornev AAP (2011) Protein Kinases: Evolution of Dynamic Regulatory Proteins. *Trends Biochem Sci* 36(2):65–77.
235. Meharena HS, et al. (2013) Deciphering the Structural Basis of Eukaryotic Protein Kinase Regulation. *PLoS Biol* 11(10). doi:10.1371/journal.pbio.1001680.
236. Adams JA (2003) Activation Loop Phosphorylation and Catalysis in Protein Kinases : Is There Functional Evidence for the Autoinhibitor Model ? Current Topics Activation Loop Phosphorylation and Catalysis in Protein Kinases : Is There Function. *Biochemistry* 42(3). doi:10.1021/bi020617o.
237. Hardie DG (2004) The AMP-activated protein kinase pathway - new players upstream and downstream. *J Cell Sci* 117(23):5479–5487.
238. Hurley RL, et al. (2005) The Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J Biol Chem* 280(32):29060–29066.
239. Hong S-P, Leiper FC, Woods A, Carling D, Carlson M (2003) Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(15):8839–8843.

240. Sutherland C, et al. (2003) Elm1p in one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex. *Curr Biol* 13:1299–1305.
241. Witczak CA, Sharoff CG, Goodyear LJ (2008) AMP-activated protein kinase in skeletal muscle: From structure and localization to its role as a master regulator of cellular metabolism. *Cell Mol Life Sci* 65(23):3737–3755.
242. Gan RY, Li H Bin (2014) Recent progress on liver kinase B1 (LKB1): Expression, regulation, downstream signaling and cancer suppressive function. *Int J Mol Sci* 15(9):16698–16718.
243. Takemoto-Kimura S, et al. (2017) Calmodulin kinases: essential regulators in health and disease. *J Neurochem*. doi:10.1111/ijlh.12426.
244. Shen W, Hanley-Bowdoin L (2006) Geminivirus infection up-regulates the expression of two Arabidopsis protein kinases related to yeast SNF1- and mammalian AMPK-activating kinases. *Plant Physiol* 142(4):1642–55.
245. Kong L-J, Hanley-Bowdoin L (2002) A geminivirus replication protein interacts with a protein kinase and a motor protein that display different expression patterns during plant development and infection. *Plant Cell* 14(8):1817–32.
246. Hey S, Mayerhofer H, Halford NG, Dickinson JR (2007) DNA sequences from arabidopsis, which encode protein kinases and function as upstream regulators of Snf1 in yeast. *J Biol Chem* 282(14):10472–10479.
247. Shiu S-H, Bleeker a. B (2001) Plant Receptor-Like Kinase Gene Family: Diversity, Function, and Signaling. *Sci Signal* 2001(113):re22-re22.
248. Shiu SH, Bleeker a B (2001) Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(19):10763–10768.
249. Torii KU (2004) Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: structure, function, and signal transduction pathways. *Int Rev Cytol* 234:1–46.
250. Bishop GJ, Koncz C (2002) Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling. *Plant Cell* 14 Suppl:S97–S110.
251. Jones DA, Jones JDG (1997) The role of leucine-rich repeat proteins in plant defences. *Adv Bot Res* 24:89–167.
252. Kistner C, Parniske M (2002) Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *7(11):511–518*.
253. Torii KU, Clark S (2000) *Receptor-Like Kinases in Plant Development* doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2296(00)32026-2.
254. Kobe B, Deisenhofer J (1994) The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci* 10:415–421.
255. Kobe B, Deisenhofer J (1993) Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. *Nature* 366(6457):751–6.
256. Ullrich A, Schlessinger J (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61(2):203–212.



257. Massague J (1996) TGF $\beta$  Signaling : Receptors , Transducers ,. 85:947–950.
258. Yin Y, et al. (2002) BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* 109(2):181–191.
259. Li J, Nam KH (2002) Regulation of Brassinosteroid Signaling by a GSK3 / SHAGGY-Like Kinase. *Science* (80- ) 295(2002):1299–1301.
260. Tsuwamoto R, Fukuoka H, Takahata Y (2008) GASSHO1 and GASSHO2 encoding a putative leucine-rich repeat transmembrane-type receptor kinase are essential for the normal development of the epidermal surface in Arabidopsis embryos. *Plant J* 54(1):30–42.
261. Racolta A, Bryan AC, Tax FE (2014) The receptor-like kinases GSO1 and GSO2 together regulate root growth in arabidopsis through control of cell division and cell fate specification. *Dev Dyn* 243(2):257–278.
262. Pfister A, et al. (2014) A receptor-like kinase mutant with absent endodermal diffusion barrier displays selective nutrient homeostasis defects. *Elife* 3:e03115.
263. Nakayama T, et al. (2017) A peptide hormone required for Casparian strip diffusion barrier formation in Arabidopsis roots. *Science* (80- ) 355(6322):284–286.
264. White PJ (2001) The pathways of calcium movement to the xylem. *J Exp Bot* 52(358):891–899.
265. Clarkson DT (1984) Calcium transport between tissues and\rits distribution in the plant. *Plant, Cell Environ* 7:449–456.
266. Wu SJ, Ding L, Zhu JK (1996) SOS1, a Genetic Locus Essential for Salt Tolerance and Potassium Acquisition. *Plant Cell* 8(4):617–627.
267. Tang RJ, et al. (2010) The woody plant poplar has a functionally conserved salt overly sensitive pathway in response to salinity stress. *Plant Mol Biol* 74(4):367–380.
268. Gao J, et al. (2016) Variation in tissue Na<sup>+</sup> content and the activity of SOS1 genes among two species and two related genera of Chrysanthemum. *BMC Plant Biol* 16(1):98.
269. Olías R, Eljakaoui Z, Pardo JM, Belver A (2009) The Na(+)/H(+) exchanger SOS1 controls extrusion and distribution of Na(+) in tomato plants under salinity conditions. *Plant Signal Behav* 4(10):973–976.
270. Feki K, Quintero FJ, Pardo JM, Masmoudi K (2011) Regulation of durum wheat Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger TdSOS1 by phosphorylation. *Plant Mol Biol* 76(6):545–556.
271. Zhu J-K, Liu J, Xiong L (1998) Genetic Analysis of Salt Tolerance in Arabidopsis: Evidence for a Critical Role of Potassium Nutrition. *Plant Cell* 10(7):1181–1192.
272. Pardo M, Cubero B, Leidi EO, Quintero FJ (2006) Alkali cation exchangers : roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *Access* 57(5):1181–1199.
273. Quintero FJ, Ohta M, Shi H, Zhu J-K, Pardo JM (2002) Reconstitution in yeast of the Arabidopsis SOS signaling pathway for Na<sup>+</sup> homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(13):9061–6.

274. Maser P (2001) Phylogenetic Relationships within Cation Transporter Families of Arabidopsis. *Plant Physiol* 126(4):1646–1667.
275. An R, et al. (2007) AtNHX8, a member of the monovalent cation:proton antiporter-1 family in Arabidopsis thaliana, encodes a putative Li<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Plant J* 49(4):718–728.
276. Liu J, Ishitani M, Halfter U, Kim CS, Zhu JK (2000) The Arabidopsis thaliana SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7):3730–3734.
277. Quan R, et al. (2007) SCABP8 / CBL10 , a Putative Calcium Sensor , Interacts with the Protein Kinase SOS2 to Protect Arabidopsis Shoots from Salt Stress. *Society* 19(April):1415–1431.
278. Halfter U, Ishitani M, Zhu JK (2000) The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc Natl Acad Sci* 97(7):3735–3740.
279. Nayak V, et al. (2006) Structure and dimerization of the kinase domain from yeast Snf1, a member of the Snf1/AMPK protein family. *Structure* 14(3):477–485.
280. Zhou H, et al. (2014) Inhibition of the Arabidopsis salt overly sensitive pathway by 14-3-3 proteins. *Plant Cell* 26(3):1166–82.
281. Kim W-Y, et al. (2013) Release of SOS2 kinase from sequestration with GIGANTEA determines salt tolerance in Arabidopsis. *Nat Commun* 4:1352.
282. Gong D, Guo Y, Jagendorf AT, Zhu J-K (2002) Biochemical characterization of the Arabidopsis protein kinase SOS2 that functions in salt tolerance. *Plant Physiol* 130(1):256–264.
283. Sánchez-Barrena MJ, Martínez-Ripoll M, Zhu JK, Albert A (2005) The structure of the Arabidopsis thaliana SOS3: Molecular mechanism of sensing calcium for salt stress response. *J Mol Biol* 345(5):1253–1264.
284. Hashimoto K, et al. (2012) Phosphorylation of calcineurin B-like (CBL) calcium sensor proteins by their CBL-interacting protein kinases (CIPKs) is required for full activity of CBL-CIPK complexes toward their target proteins. *J Biol Chem* 287(11):7956–7968.
285. Batistič O, Waadt R, Steinhorst L, Held K, Kudla J (2010) CBL-mediated targeting of CIPKs facilitates the decoding of calcium signals emanating from distinct cellular stores. *Plant J* 61(2):211–222.
286. Zhao Y, Wang T, Zhang W, Li X (2011) SOS3 mediates lateral root development under low salt stress through regulation of auxin redistribution and maxima in Arabidopsis. *New Phytol* 189(4):1122–1134.
287. Van Oosten MJ, Sharkhuu A, Batelli G, Bressan RA, Maggio A (2013) The Arabidopsis thaliana mutant air1 implicates SOS3 in the regulation of anthocyanins under salt stress. *Plant Mol Biol* 83(4–5):405–415.
288. Ye J, Zhang W, Guo Y (2013) Arabidopsis SOS3 plays an important role in salt tolerance by mediating calcium-dependent microfilament reorganization. *Plant Cell Rep* 32(1):139–148.

289. Haro R, Garciadeblas B, Rodríguez-Navarro A (1991) A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett* 291(2):189–191.
290. Wieland J, Nitsche AM, Strayle J, Steiner H, Rudolph HK (1995) The PMR2 gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na<sup>+</sup> pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J* 14(16):3870–82.
291. Bañuelos MA, Rodríguez-Navarro A (1998) P-type ATPases mediate sodium and potassium effluxes in *Schwanniomyces occidentalis*. *J Biol Chem* 273(3):1640–1646.
292. Nass R, Cunningham KW, Rao R (1997) Intracellular Sequestration of Sodium by a Novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger in Yeast Is Enhanced by Mutations in the Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase: INSIGHTS INTO MECHANISMS OF SODIUM TOLERANCE. *J Biol Chem* 272(42):26145–26152.
293. Quintero FJ, Blatt MR, Pardo JM (2000) Functional conservation between yeast and plant endosomal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters. *FEBS Lett* 471(2–3):224–228.
294. Darley CP, van Wuytswinkel OC, van der Woude K, Mager WH, de Boer AH (2000) *Arabidopsis thaliana* and *Saccharomyces cerevisiae* NHX1 genes encode amiloride sensitive electroneutral Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. *Biochem J* 351(Pt 1):241–9.
295. Lemailet G, et al. (1999) Identification and characterization of plant transporters using heterologous expression systems. 50(June):1073–1087.
296. Toyn JH, Gunyuzlu P, White WH, Thompson LA, Hollis GF (2000) A counterselection for the tryptophan pathway in yeast: 5-Fluoroanthranilic acid resistance. *Yeast* 16(6):553–560.
297. Guthrie C, Fink G (1991) Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol* 194:795–823.
298. Ausubel F, et al. (1996) *Current Protocols in Molecular Biology* eds Publishing G, Interscience W (New York).
299. Rodríguez-Navarro A, Ramos J (1984) Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 159(3):940–945.
300. Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* 15(3):473–497.
301. Barragán V, et al. (2012) Ion exchangers NHX1 and NHX2 mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24(3):1127–42.
302. Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96(1):23–28.
303. Holsters M, et al. (1978) Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen Genet* 163(2):181–187.
304. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. ed Press CSHL (Cold Spring Harbor). 2nd Ed.
305. Elble R (1992) A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques* 13(1):18–20.

306. Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16(6):735–743.
307. Waadt R, Kudla J (2008) In Planta Visualization of Protein Interactions Using Bimolecular Fluorescence Complementation ( BiFC ). *Spring* 3(4):1–7.
308. Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19(6):1349.
309. Mitchell DA, Marshall TK, Deschenes RJ (1993) Vectors for the inducible overexpression of glutathione S-transferase fusion proteins in yeast. *Yeast* 9(7):715–722.
310. Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* 9(4):789–798.
311. EMBL Clustal Omega. Available at: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.
312. National Center for Biotechnology Information NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
313. Center ABR tair. Available at: <https://www.arabidopsis.org/>.
314. Consortium U Uniprot. Available at: <http://www.uniprot.org/>.
315. SALK T-DNA Express: Arabidopsis Gene Mapping Tool. Available at: <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>.
316. Quintero FJ, et al. (2011) Activation of the plasma membrane Na/H antiporter Salt-Overly-Sensitive 1 (SOS1) by phosphorylation of an auto-inhibitory C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(6):2611–6.
317. Núñez-Ramírez R, et al. (2012) Structural insights on the plant salt-overly-sensitive 1 (SOS1) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *J Mol Biol* 424(5):283–294.
318. Hurley JH, Dean AM, Sohl JL, Koshland DE, Stroud RM (1990) Regulation of an enzyme by phosphorylation at the active site. *Science* 249(4972):1012–1016.
319. Gould KL, Moreno S, Owen DJ, Sazer S, Nurse P (1991) Phosphorylation at Thr167 is required for *Schizosaccharomyces pombe* p34cdc2 function. *EMBO J* 10(11):3297–309.
320. Saito H, Tatebayashi K (2004) Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast. *J Biochem* 136(3):267–272.
321. Djamei A (2009) Trojan Horse Strategy in *Agrobacterium* Transformation: Abusing MAPK Defense Signaling. *Science (80- )* 453(2007):453–457.
322. Umbrasaite J, et al. (2010) MAPK phosphatase AP2C3 induces ectopic proliferation of epidermal cells leading to stomata development in *Arabidopsis*. *PLoS One* 5(12). doi:10.1371/journal.pone.0015357.
323. Wang H, et al. (2008) Haplo-Insufficiency of MPK3 in MPK6 Mutant Background Uncovers a Novel Function of These Two MAPKs in *Arabidopsis* Ovule Development. *Plant Cell Online* 20(3):602–613.
324. Han S, Fang L, Ren X, Wang W, Jiang J (2015) MPK6 controls H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -induced root

- elongation by mediating Ca<sup>2+</sup> influx across the plasma membrane of root cells in Arabidopsis seedlings. *New Phytol* 205(2):695–706.
325. Han S, Wang C wen, Wang W le, Jiang J (2014) Mitogen-activated protein kinase 6 controls root growth in Arabidopsis by modulating Ca<sup>2+</sup>-based Na<sup>+</sup> flux in root cell under salt stress. *J Plant Physiol* 171(5):26–34.
  326. EXPASy SIM Alignment Tool. Available at: <http://web.expasy.org/sim/>.
  327. Gong D, Gong Z, Guo Y, Chen X, Zhu JK (2002) Biochemical and functional characterization of PKS11, a novel Arabidopsis protein kinase. *J Biol Chem* 277(31):28340–28350.
  328. Uozumi N, et al. (2000) The Arabidopsis HKT1 gene homolog mediates inward Na<sup>+</sup> currents in xenopus laevis oocytes and Na<sup>+</sup> uptake in Saccharomyces cerevisiae. *Plant Physiol* 122(April):1249–1259.
  329. Hendus-Altenburger R, et al. (2017) A phosphorylation-motif for tuneable helix stabilisation in intrinsically disordered proteins – Lessons from the sodium proton exchanger 1 (NHE1) A phosphorylation-motif for tuneable helix stabilisation in intrinsically disordered proteins – Lessons from . *Cell Signal* 1(NHE1):40–51.
  330. Lin H, et al. (2009) Phosphorylation of SOS3-LIKE CALCIUM BINDING PROTEIN8 by SOS2 protein kinase stabilizes their protein complex and regulates salt tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* 21(5):1607–19.
  331. López-Bucio JS, et al. (2014) Arabidopsis thaliana mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *J Exp Bot* 65(1):169–183.
  332. Overmyer K (2000) Ozone-Sensitive Arabidopsis rcd1 Mutant Reveals Opposite Roles for Ethylene and Jasmonate Signaling Pathways in Regulating Superoxide-Dependent Cell Death. *Plant Cell Online* 12(10):1849–1862.
  333. Katiyar-Agarwal S, et al. (2006) The plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter SOS1 interacts with RCD1 and functions in oxidative stress tolerance in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(49):18816–18821.
  334. Proft M, Struhl K (2004) MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell* 118(3):351–61.
  335. Bolle C, et al. (2013) GABI-DUPLO: A collection of double mutants to overcome genetic redundancy in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 75(1):157–171.
  336. Glab N, et al. (2016) The impact of Arabidopsis thaliana SNF1-Related Kinase 1 (SnRK1) Activating Kinase (SnAK) 1 and 2 on SnRK1 phosphorylation status: Characterisation of a SnAK double mutant. *Plant J* 38(1):42–49.
  337. San-Bento R, Farcot E, Galletti R, Creff A, Ingram G (2014) Epidermal identity is maintained by cell-cell communication via a universally active feedback loop in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 77(1):46–58.
  338. Doblas VG, et al. (2017) Root diffusion barrier control by a vasculature-derived peptide binding to the SGN3 receptor. *Science* (80- ) 355(6322):280–284.

339. Barberon M, et al. (2016) Adaptation of Root Function by Nutrient-Induced Plasticity of Endodermal Differentiation. *Cell* 164(3):447–459.
340. Sánchez-Aguayo I, Rodríguez-Galán JM, García R, Torreblanca J, Pardo JM (2004) Salt stress enhances xylem development and expression of S-adenosyl-L-methionine synthase in lignifying tissues of tomato plants. *Planta* 220(2):278–285.
341. Quan R, et al. (2017) EIN3 and SOS2 synergistically modulate plant salt tolerance. *Sci Rep* 7(September 2016):44637.
342. Cho HY, Wen TN, Wang YT, Shih MC (2016) Quantitative phosphoproteomics of protein kinase SnRK1 regulated protein phosphorylation in Arabidopsis under submergence. *J Exp Bot* 67(9):2745–2760.
343. Lejay L, et al. (2008) Oxidative pentose phosphate pathway-dependent sugar sensing as a mechanism for regulation of root ion transporters by photosynthesis. *Plant Physiol* 146(4):2036–53.
344. Pardo M, Rubio F (2011) *Transporters and Pumps in Plant Signaling* eds Geisler M, Venema K (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg) doi:10.1007/978-3-642-14369-4.
345. Baena-González E, Sheen J (2008) Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci* 13(9):474–482.